N° d'enregistrement
au C.N.R.S.

A.O. 8546

THESE DE DOCTEUR INGENIEUR

Présentée

A L'UNIVERSITE PARIS VI

PAR

M. Bassam BAYAAH

Pour obtenir

le titre de Docteur Ingénieur

Sujet de la Thèse: ETUDE PHYSIO-PATHOLOGIQUE DE L'INFECTION FONGIQUE DES POMMES PAR LES PARASITES DE BLESSURES ET LES PARASITES LATENTS.

Soutenue le 2 - MAI 1973 **devant la Commission d'Examen**

MADAME A. NOUGAREDE ..... Président

MM. C. LANCE .....
G. VIENNOT-BOURGIN ..... Examinateurs
J.P. SCHRANTZ .....

G. BOMPEIX ..... Invité

N° d'enregistrement
au C.N.R.S.

A,0, 8546

THESE DE DOCTEUR INGENIEUR

Présentée

A L'UNIVERSITE PARIS VI

PAR

M. Bassam BAYAAH

Pour obtenir

le titre de Docteur Ingénieur

Sujet de la Thèse: ETUDE PHYSIO-PATHOLOGIQUE DE L'INFECTION FONGIQUE DES POMMES PAR LES PARASITES DE BLESSURES ET LES PARASITES LATENTS.

Soutenue le 2 - MAI 1973 **devant la Commission d'Examen**

MADAME A. NOUGAREDE ..... Président

MM. C. LANCE .....
G. VIENNOT-BOURGIN ..... } Examinateurs
J.P. SCHRANTZ .....

G. BOMPEIX ..... Invité

UNIV.
LEIDEN

S O M M A I R E

pages

1. INTRODUCTION 1

2. MATERIEL ET TECHNIQUES 6

2.1. MATERIEL VEGETAL 6

2.2. TECHNIQUES D'INOCULATION 6

2.3. CULTURE SUR MILIEUX "SOLIDES" 7

2.4. CULTURE SUR MILIEUX LIQUIDES AGITES 7

2.5. DETERMINATION DU POIDS SEC DU MYCELIUM OBTENU EN CULTURE AGITE 9

2.6. OBTENTION DES PREPARATIONS ENZYMATIQUES 9

2.7. PREPARATION DES SUBSTRATS DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE 10

27.1. Substrat pour la mesure des activités cellulolytiques .. 10

27.2. " " " " " " méthylgalacturonases et galacturonases (hydrolases et lyases) 10

27.3. Substrat pour la mesure de l'activité pectineméthylestérase 11

27.4. Substrat pour la mesure de l'activité xylanase 11

27.5. " " " " " " protéolytique 11

27.6. Réactif D.N.S. 12

2.8. MESURES DES ACTIVITES ENZYMATIQUES 12

28.1. Mesure de l'activité exo-PG, exo-C_x et exo-xylanase 12

28.2. " " " endo-PMG, endo-PG et endo-C_x 13

28.3. " " " pectate-lyase 14

28.4. " " " pectineméthylestérase 15

28.5. " " " protéolytique 15

3. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE GENERALE

3.1. LES POURRITURES MOLLES DES POMMES 17

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548021_0008

Pages

3.2. CONSTITUANTS CHIMIQUES DES PAROIS CELLULAIRES 18

32.1. Composés pectiques 18

32.2. Evolution des composés pectiques au cours de la maturation 19

32.3. Cellulose 20

32.4. Hémicellulose 21

32.5. Protéines 22

3.3. MODE D'ACTION DES ENZYMES SUR LES PAROIS CELLULAIRES 23

33.1. Enzymes pectinolytiques 23

. Pectineméthylestérase 23

. Pectine-glycosidases et lyases 23

33.2. Enzymes cellulolytiques 25

33.3. Enzymes protéolytiques 26

3.4. ROLE DES ENZYMES DANS LA GENESE DES POURRITURES MOLLES 28

3.5. " " " " LE CAS SPECIAL DES POURRITURES DE POMMES 30

4. ACTIVITES ENZYMATIQUES "in VITRO" 34

4.1. ENZYMES CELLULOLYTIQUES 34

41.1. Culture sur cellulose insoluble 34

A - Résultats 34

B - Conclusion 35

41.2. Culture sur C.M.C. en milieu agité 35

A - Résultats 35

B - Conclusion 39

4.2. ENZYMES PECTINOLYTIQUES 40

42.1. Pectineméthylestérase 40

A - Résultats 40

B - Conclusion 41

42.2. Endo-polyméthylgalacturonase 42

A - Résultats 42

B - Conclusion 44

4.3. ENZYMES HEMICELLULOLYTIQUES (xylanase) 45

A - Résultats 45

B - Conclusion 46

Pages

4.4. ENZYMES PROTEOLYTIQUES 47
A - Résultats 47
B - Conclusion 49

4.5. CROISSANCE PONDERALE EN FONCTION DES SUBSTRATS UTILISES 49
A - Résultats 49
B - Conclusion 50

4.6. INFLUENCE DES ACIDES AMINES SUR LA PRODUCTION D'ENZYMES PECTINOLYTIQUES "in VITRO" 50
A - Résultats 51
B - Conclusion 61

5. ACTIVITES ENZYMATIQUES "in VIVO" 62

5.1. ENZYMES CELLULOLYTIQUES 62
A - Résultats 62
B - Conclusion 63

5.2. ENZYMES PECTINOLYTIQUES 64

52.1. Activité pectineméthylestérase 64
A - Résultats 64
B - Conclusion 64

52.2. Polyméthylgalacturonases et polygalacturonases 65
A - Résultats 65
B - Conclusion 68

5.3. ENZYMES HEMICELLULOLYTIQUES 69
A - Résultats 69
B - Conclusion 69

5.4. ENZYMES PROTEOLYTIQUES 70
A - Résultats 70
B - Conclusion 72

6. ACTIVITES ENZYMATIQUES SUR CULTURE DES TISSUS 73
A - Résultats 73
B - Conclusion 79

7. DISCUSSION et CONCLUSION GENERALES 80

B I B L I O G R A P H I E 86

1. INTRODUCTION

On utilise couramment aujourd'hui les températures basses (0° à 4°) en présence d'une hygrométrie élevée (90 - 95 %) pour conserver les produits végétaux fraîchement récoltés dans un état physiologique et de turgescence convenables, susceptibles d'en permettre la distribution échelonnée sur les marchés et la vente à des périodes favorables. En ce qui concerne l'entreposage des pommes, celui-ci peut durer 8 mois.

Dans les enceintes aménagées en vue de la conservation des fruits, des légumes, quelquefois aussi des fleurs, l'eau rejetée lentement par les plantes ou fragments de plante contribue à augmenter le taux d'humidité ambiante particulièrement favorable à l'installation, puis au développement souvent très rapide, de nombreux micromycètes qui se comportent en agents de pourriture. Ces organismes, dont l'écologie est très particulière, ont, actuellement, dans tous les pays, une grande importance économique.

Les recherches relatives aux meilleures conditions d'entreposage des fruits (en particulier les pommes et les poires) et les différents dispositifs industriels utilisés qui en découlent démontrent que malgré toutes les précautions d'ordre phytosanitaire qui interviennent au niveau du verger, on observe cependant au cours de la période d'entreposage de nombreuses altérations. Ce sont en général des pourritures molles.

C'est ainsi qu'en ce qui concerne les pommes, VIENNOT-BOURGIN (1966) estime qu'on peut distinguer 3 grands groupes d'agents de pourriture, évoluant après la cueillette ou au cours de la conservation. Ces différents groupes se distinguent entre eux essentiellement par la période où se situe leur installation, cette période pouvant être définie par un état de développement du fruit ou par une ambiance liée aux nécessités d'une conservation de longue durée.

On peut ainsi classer de la façon suivante les champignons destructeurs des pommes.

1) - Certains parasites ne font que poursuivre leur évolution, et leur présence tient au fait que des fruits malades ont été, par négligence, entreposés en même temps que des fruits indemnes ; un exemple particulièrement spectaculaire est celui de la pourriture grise due au *Botrytis cinerea* PERS.(*) En outre des parasites sub-cuticulaires peuvent croître très lentement au cours de la conservation, poursuivant un développement déjà entamé au verger, c'est le cas de la tavelure dite de conservation, due à l'*Endostigme inaequalis* (CKE).SYD.

2) - Des fruits, d'apparence saine, mais ayant subi des chocs ou des blessures au cours de la récolte, se trouvent contaminés par des spores dont l'origine se situe aussi bien au verger qu'à l'entrepôt, capables de germer rapidement et de provoquer des pourritures dès les premiers jours de l'entreposage. C'est le cas du *Penicillium expansum* LINK, *Botrytis cinerea* PERS., *Monilia fructigena* PERS., *Rhizopuz nigricans* EHR., *Alternaria tenuissima* (FR.) WILTSH, *Cladosporium herbarum* (PERS.) LK., etc...

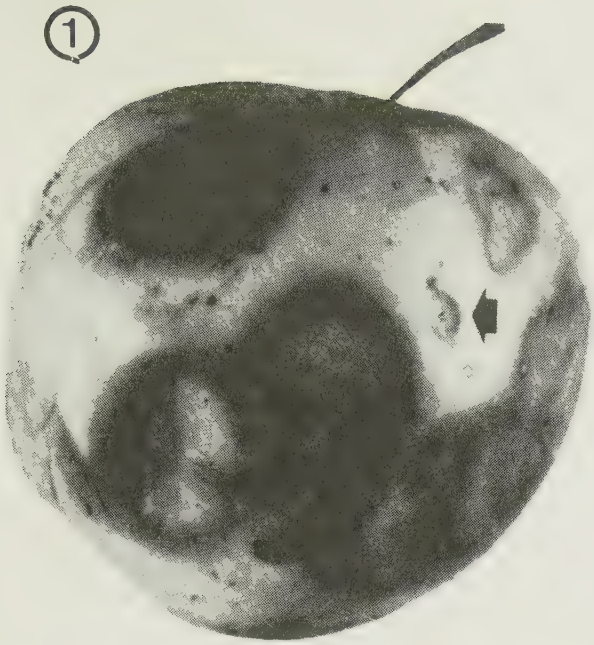
Les champignons cités dans ce groupe sont appelés parasites de blessures, ils envahissent le fruit sans délai en bénéficiant de la disparition de barrières naturelles (résistance épidermique) qui peuvent interdire normalement leur installation.

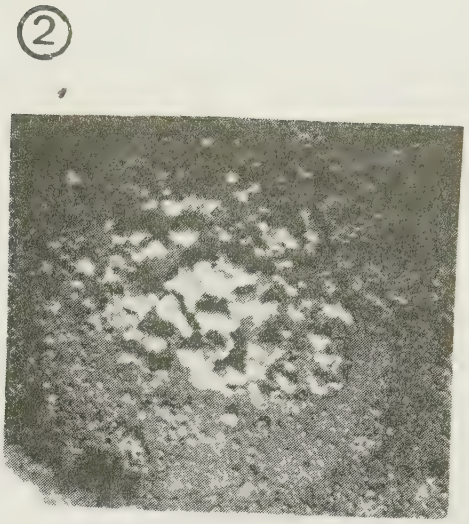
3) - D'autres fruits sont soumis à une infection qui bien qu'ayant pour origine des germes présents au verger ne devient apparente qu'après une très longue période et à la suite de modifications profondes dans la nature du fruit (transformations morphologiques et biochimiques précédant ou accompagnant la maturation). Les parasites de ce groupe sont nommés parasites latents (BONDOUX et al. , 1969).Voir photos page 3.

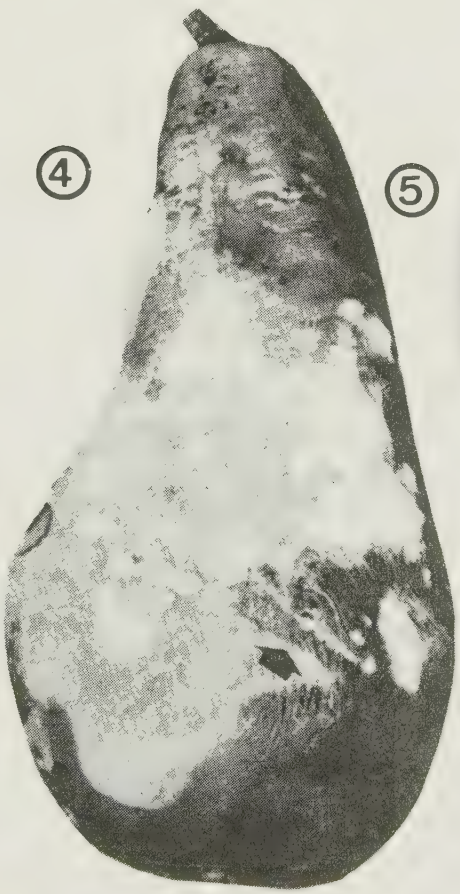
En France on rencontre essentiellement dans ce groupe le *Pezicula alba* GUTHRIE, et *P. malicorticis* (JACKS.) NANNF., le *Nectria galligena* BRES.

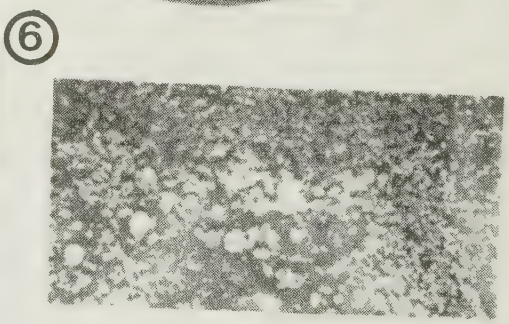
---

* les noms d'auteurs de champignons ne sont précisés qu'une seule fois dans le texte au fur et à mesure de la citation de l'espèce.









pomme attaquée par *Pezicula alba* - 2. Photo 1 agrandie montrant la fructification du champignon.

-4. poires attaquées par *Botrytis cinerea* à la suite d'une blessure.

pomme envahie par le *Penicillium expansum*. La pourriture a gagné la quasi-totalité du fruit - 6. Photo 5 agrandie montrant la fructification du *P. expansum*.

Les flèches indiquent le point de départ de l'infection (lenticelle, Fig. 1 - blessure, Fig. 3 et 5).

Dans ce cas la pénétration s'effectue presque exclusivement au niveau des lanticelles.

Nous avons plus particulièrement examiné les actions enzymatiques qui se manifestent au sein ou à la périphérie des lésions provoquées depuis la surface cuticulaire jusqu'à une certaine profondeur dans la chair du fruit. Ce travail a été complété par une recherche des activités enzymatiques in vitro, en utilisant des milieux synthétiques. Il nous a paru nécessaire de comparer la cinétique de production des enzymes en opposant les parasites latents et les parasites de blessures ainsi que l'effet,sur ce phénomène, de certains nutriments.

Seules les principales espèces ont été envisagées. Pour les parasites de blessures nous avons retenu le *Botrytis cinerea* et le *Penicillium expansum*. Occasionnellement l'*Alternaria tenuissima* et le *Cladosporium herbarum* ont été utilisés in vitro seulement. Les parasites latents sont représentés dans notre étude par le *Pezicula alba* et le *P. malicorticis* responsables de la quasi-totalité des pertes en entreposage de longue durée.

Avant de donner les résultats de nos observations, nous avons le plaisir de remercier tous ceux qui se sont intéressés à nos travaux, nous ont aidé et encouragé au cours de ces années de recherches.

Il nous est agréable d'exprimer notre déférente gratitude à Monsieur le Professeur G. VIENNOT-BOURGIN. Il nous a accueilli dans son laboratoire et, avec beaucoup de patience et de compréhension, il nous a guidé dans ce travail. Son autorité scientifique nous a été d'un inestimable secours. Il ne nous a ménagé ni ses conseils, ni ses encouragements. Aussi est-ce pour nous un devoir agréable que de lui adresser ici nos sincères remerciements.

Nous sommes heureux de pouvoir exprimer à Madame le Professeur NOUGAREDE ainsi qu'à tous nos Professeurs du D.E.A.,qui ont contribué à notre formation scientifique en biologie végétale,notre profonde reconnaissance. Nous la remercions aussi de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Nous remercions Monsieur le Professeur LANCE et Monsieur le Professeur SCHRANTZ d'avoir bien voulu examiner ce travail, et nous sommes sensible à l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de participer à ce jury.

Notre gratitude s'adresse à Monsieur BOMPEIX, Maître-Assistant au Laboratoire de Phytopathologie à l'Institut National Agronomique pour nous avoir initié à la recherche, pour les conseils et les encouragements généreux qu'il n'a cessé de nous prodiguer tout au long de ce travail, et pour son aide cordiale dans la rédaction du texte.

Nous remercions le Gouvernement Syrien qui nous a permis de continuer nos études en France, et plus spécialement Monsieur le Professeur HOUREIEH, Doyen de la Faculté d'Agriculture d'ALEP pour leur soutien financier et moral.

Nos remerciements vont également à MM. PLANQUE et POIRET, techniciens, pour leur aimable participation aux épreuves de laboratoire, ainsi qu'à Madame PINEL qui a assuré la réalisation matérielle de ce mémoire.

°

° °

2 - MATERIEL ET TECHNIQUES

2.1. MATERIEL VEGETAL -

Les différents champignons utilisés pour nos expériences, Botrytis cinerea, Penicillium expansum, Pezicula alba et P. malicorticis, ont été isolés en culture pure par prélèvement aseptique de fragments de tissus parasités de fruit.

Les préparations enzymatiques sont obtenues à partir de pourritures provoquées soit naturellement, soit artificiellement après inoculation des fruits du cultivar *"Golden delicious"* à l'aide des champignons étudiés.

Pour maintenir une certaine homogénéité dans la qualité et les dimensions des fruits, ceux-ci ont été constamment prélevés dans un verger situé dans le Département de l'Aisne.

Les cultures de tissus de pomme ont été fournies par le laboratoire de physiologie pluricellulaire du C.N.R.S. (Gif-sur-Yvette). NITSCH et al. (1970).

2.2. TECHNIQUES d'INOCULATION -

La méthode d'inoculation varie selon qu'il s'agit d'un parasite de blessures ou d'un parasite lenticellaire.

1) - Inoculation des parasites de blessures

On commence d'abord par préparer un broyat de culture. A cet effet chaque culture est découpée à l'emporte-pièce sous forme de deux cercles concentriques dont les rayons sont distants de 5 mm., le plus petit cercle couvrant presque toute la colonie ; ceci afin de ne prélever que le mycélium frontal. L'opération est répétée sur un nombre de boîtes suffisant pour obtenir une surface mycélienne de 75 cm^2. Le broyage s'effectue ensuite au mixer pendant 5 mn. avec le minimum d'eau. On ajuste finalement, par addition d'eau stérile, au volume de 1 litre.

L'inoculation proprement dite a lieu par blessures superficielles de l'épiderme des pommes pratiquées à l'aide d'une aiguille lancéolée préalablement désinfectée. On dépose une goutte de la solution aqueuse de broyat mycélien.

Cette méthode a l'avantage d'être reproductible quelle que soit l'étendue des cultures (BOMPEIX 1972), car on ne prélève que la partie jeune du mycélium. L'inoculum ainsi préparé doit être utilisé immédiatement.

2) - Inoculation des parasites latents

On peut employer la même méthode que celle décrite ci-dessus, mais le développement des pourritures est de toute manière beaucoup plus lent. Une deuxième méthode, se rapprochant des conditions naturelles, consiste à pulvériser une suspension de spores (10^6 spores/ml) sur les fruits, ces derniers seront ensuite conservés au frigorifique à + 6° et en humidité relative élevée. L'apparition des pourritures dans ce cas, se fera au bout d'un temps très long (plusieurs semaines).

2.3. CULTURE SUR MILIEUX *"SOLIDES"*.

Les milieux gélosés en boîtes de Pétri, ont surtout servi à l'obtention des inoculums, soit pour les cultures agitées, soit pour réaliser des inoculations expérimentales. Le milieu de culture utilisé contient 2 % d'extrait de malt *"Maltéa"* et 2 % de gélose.

Un milieu spécial à base de protéines a aussi été confectionné à la fois pour étudier la croissance sur ces substrats, et rechercher les activités enzymatiques protéolytiques (cf. infra).

2.4. CULTURE SUR MILIEUX LIQUIDES AGITES.

La culture dans un milieu aéré agité constitue une bonne méthode pour l'étude du métabolisme des champignons (FOSTER 1949). En effet, les cellules cultivées de cette façon sont exposées d'une manière plus uniforme aux facteurs physiques et chimiques environnants.

Dans ces conditions, la croissance des cultures du champignons va dépendre surtout de sa nature, de la composition et la concentration des différents éléments nutritifs du milieu, de l'intensité de l'agitation, et du volume total du liquide dans le récipient.

L'agitation permet une bonne aération du milieu de culture. En réglant convenablement celle-ci, il sera possible de se rapprocher des conditions optimales de croissance des microorganismes.

La masse de mycélium obtenue de cette manière possède une surface cellulaire considérable, ce qui permet une augmentation notable de l'absorption de l'oxygène dissout, une consommation augmentée des éléments nutritifs en même temps que l'excrétion du gaz carbonique, et des produits du catabolisme.

En prenant comme hypothèse de travail que la composition du milieu joue un grand rôle dans la production d'enzymes par les champignons, nous avons pris en considération les conclusions de BANKS et al. (1967). Selon ces auteurs, un milieu destiné à la production d'enzymes doit répondre aux principales propriétés suivantes :

- contenir les éléments nutritifs nécessaires à la croissance du microorganisme ;
- posséder un bon équilibre des divers éléments nutritifs ;
- avoir un pH convenable ;
- contenir un inducteur de l'activité enzymatique.

Pour notre part, c'est la solution minérale du milieu de RICHARDS que nous avons choisie comme base pour la production d'enzymes, auquel nous avons ajouté, selon le cas, comme seule source de carbone, 1 g de carboxyméthylcellulose (C.M.C.) (TOUZART et MATIGNON) ou 1 g de pectine méthylée (Ruban brun) à 95 % , ou encore 1 g de xylane (N.B.C.). Ces milieux sont homogénéisés au mixer.

La C.M.C. est facile à solubiliser, ainsi que la pectine. Toutefois il est souhaitable, pour cette dernière, d'en faire une suspension dans une quantité très faible d'alcool à 90° avant de la répartir dans le milieu, pour éviter la formation de grumeaux. Par contre le xylane est complètement insoluble dans l'eau et nous avons donc été obligé de travailler sur une suspension aqueuse de ce produit préalablement purifié.

Pour la purification du xylane commercial (STROBEL, 1963), 2 g ont été mis en suspension dans 180 ml d'eau distillée et mélangés au mixer. La suspension est ensuite centrifugée à 5000 T.P.M. pendant 10 minutes ; puis le précipité est lavé deux fois par 100 ml d'éthanol absolu et une fois par 100 ml d'éther.

Le milieu de culture est réparti à raison de 100 ml par boîte de Roux.

Les boîtes sont ensuite stérilisées à 120° pendant 20 mn. Après inoculation par des fragments calibrés de mycélium frontal, elles sont soumises à une agitation (agitateur *New Brunswick Scientific G2*) à raison de 75 secousses/minute, avec une amplitude de 5 cm.

2.5. DETERMINATION DU POIDS SEC DE MYCELIUM OBTENU EN CULTURE AGITEE -

Le mycélium est récupéré sur un préfiltre millipores dont le poids sec a été déterminé à l'avance, lavé deux à trois fois avec de l'eau distillée, puis séché dans une étuve à 100°. Au bout de 24 à 36 heures de séchage, on peut déterminer le poids sec de l'échantillon (DORN et RIVER, 1966).

Le filtrat est d'autre part conservé au congélateur à - 35°.

Cette méthode n'a été utilisée que pour les substrats à base de C.M.C. et de pectine. Pour ceux contenant du xylane, nous avons été obligé d'utiliser une technique différente du fait de la non solubilité de ce substrat qu'il faut séparer du mycélium.

Les cultures sont centrifugées à 4500 T.P.M. pendant 15 mn. Le culot contenant le xylane et le mycélium est traité trois fois par une solution de NaOH à 10 % et centrifugé après chaque traitement afin d'éliminer le xylane. Le mycélium obtenu ainsi sera lavé avec de l'eau distillée, récupéré sur un préfiltre millipores, et séché comme dans le cas précédent.

La quantité de mycélium perdue lors de l'hydrolyse par la soude est négligeable.

2.6. OBTENTION DES PREPARATIONS ENZYMATIQUES -

Les tissus sains ou parasités sont broyés au moyen d'un mixer avec une quantité d'extracteur telle qu'à un ml d'extrait correspond 0,25 g de poids frais. Le mélange extracteur est constitué d'un tampon Mc ILVAINE pH 7,0 NaCl 10 % (BOMPEIX, 1972).

Afin de faciliter le broyage, on incorpore au mélange une petite quantité de sable très fin selon la technique de LANCE (1963). Le broyat obtenu est ensuite centrifugé à 5000 T.P.M. pendant 10 mn. Une filtration sur préfiltre millipores peut être nécessaire. Toutes ces opérations s'effectuent à basse température (4°) en chambre froide.

Pour la mesure des exo-enzymes, il est nécessaire d'éliminer les glucides réducteurs préexistants par une dialyse de 48 heures à 0° contre de l'eau distillée renouvelée (3 fois).

Pour vérifier l'absence de certaines enzymes dont l'activité serait passée inaperçue, on peut, par une opération inverse, concentrer l'extrait par dialyse contre du polyéthylène glycol (BOMPEIX, loc.cit.), ou encore en procédant à une précipitation par le sulfate d'ammonium à saturation (plusieurs heures sont nécessaires pour une bonne précipitation) ; une redissolution dans un milieu tamponné réajusté volumétriquement à la valeur choisie est ensuite réalisée.

Une nouvelle dialyse est indispensable pour éliminer le $SO_4(NH_4)_2$, bien que le sel résiduel ne semble pas affecter ultérieurement l'activité enzymatique.

Dans le cas des cultures agitées, le filtrat est utilisé comme une préparation enzymatique, bien qu'une dialyse soit parfois nécessaire pour éliminer les glucides réducteurs indésirables.

2.7. PREPARATION DES SUBSTRATS DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE -

27.1. Substrat pour la mesure des activités cellulolytiques

A 5 g de C.M.C. anhydre (carboxyméthylcellulose) (TOUZART et MATIGNON) on ajoute 450 ml d'un tampon citrate pH 5,0 et on agite vigoureusement jusqu'à ce que la solution soit claire. 5 ml de merthiolate à 1 % sont ajoutés à la solution afin d'empêcher les contaminations par les microorganismes. On complète ensuite à 500 ml avec le tampon dans une fiole jaugée.

27.2. Substrat pour la mesure des activités méthylgalacturonases et galacturonases (hydrolases et lyases)

On introduit 5 g de pectine hautement méthylée (pectine "Ruban brun" unipectine S.A. REDON ,35, qui est méthylée à 95 %) ou 6 g d'acide polygalac-

turonique dans 200 ml d'eau distillée. Dans le cas de la pectine, on ajoute 2,5 g d'oxalate d'ammonium, suivant la technique de MARAITE (1969) pour éviter la gélification du substrat. Après dissolution complète (plusieurs heures) le pH est ajusté à 5,0 ou 5,5 ; on ajoute ensuite 250 ml de tampon Mc ILVAINE pH 5,0 ou 5,5 à une concentration double, et on ajuste à 500 ml dans une fiole jaugée.

27.3. Substrat pour la mesure de l'activité pectineméthylestérase

On introduit 10 g de pectine "Ruban brun" dans 800 ml d'eau distillée avec 5,84 g de NaCl et quelques gouttes d'une solution soit de rouge de méthyle (mesure en milieu acide) soit de bleu de bromo thymol (mesure en milieu alcalin). Ces indicateurs colorés sont nécessaires pour effectuer un contrôle visuel de l'évolution du pH lors de l'action de la P.M.E.. Le pH est ajusté à 5,0 ou 5,5 (P.M.E. fongique) soit à 7,5 (P.M.E. des plantes supérieures). On ajoute 10 ml de merthiolate de sodium à 1 % et on ajuste finalement à 1000 ml avec de l'eau distillée dans une fiole jaugée. On obtient ainsi une solution de pectine non tamponnée à 1 %, NaCl 0,1 M.

27.4. Substrat pour la mesure de l'activité xylanase

Une suspension de xylane purifié (cf.supra) est réalisée à 1 % dans un tampon citrate 0,05 M pH 4,0.

27.5. Substrat pour la mesure de l'activité protéolytique

Deux substrats ont été réalisés de la même manière que les milieux de culture à raison de 15 ml par boîte de Pétri.

Milieu 1

- gélose 15 g
- protéine à tester 7 g
- PO_4HK_2 2,5 g
- eau Q.S.P. 1000 ml

pH 6,3

Milieu 2

- gélose 15 g
- caséine 3 g
- protéine à tester 7 g
- $PO_4H K_2$ 2,5 g
- eau Q.S.P. 1000 ml

pH 6.3

En plus de la protéine à tester on peut ajouter de la caséine au substrat 1 suivant la technique de GLENZA (1969).

Les milieux 1 et 2 sont destinés à la culture des champignons. Cependant, si l'on y ajoute du merthiolate de sodium (100 ppm) on pourra observer l'action de préparations enzymatiques.

27.6. Réactif D.N.S.

Solution A

300 ml	NaOH	4,5 %
880 ml	acide dinitrosalicylique	1 %
225 g	tartrate de sodium et potassium	

Solution B

10 g	phénol cristallisé	
22 ml	NaOH	10 %
q.s.p. 100 ml	eau distillée	

A 69 ml de la solution B sont ajoutés 6,9 g de disulfate de sodium et le tout est mélangé à la totalité de la solution A jusqu'à ce que tout le tartrate soit dissout. Le réactif peut être conservé au réfrigérateur.

2.8. MESURES DES ACTIVITES ENZYMATIQUES -

28.1. Mesure de l'activité exo-PG, exo-Cx et exo-xylanase[1]

Leur recherche, basée sur la mesure des groupements réducteurs formés aux dépens de leur substrat respectif (cf. supra), est effectuée selon la méthode de KELMAN et COWLING (1967).

---

(1) - Dans le texte nous utiliserons les abréviations :
Polygalacturonase (PG) - Polyméthylgalacturonase (PMG) - Cellulase (Cx)
Pectineméthylestérase (PME) - Polygalacturonate-transéliminase (PTE)

Le milieu réactionnel est constitué de 3 ml de préparation enzymatique et de 6 ml de substrat (pectine, polypectate de sodium, CMC, xylane purifié cf. supra). Après incubation de 5 heures à 30°, on prélève 1 ml de mélange réactionnel. Un témoin est réalisé en mélangeant l'un ou l'autre des substrats sans incubation aux préparations enzymatiques.

A 1 ml du mélange réactionnel, on ajoute 3 ml de réactif D.N.S. dans un tube à essais étalonné à 25 ml. On porte ensuite au bain-marie bouillant pendant 5 mn. exactement, puis on refroidit dans un bain de glace. On ajuste ensuite le volume à 25 ml avec de l'eau distillée. Les densités optiques sont mesurées au spectrophotomètre à 575 nm.

Les résultats sont comparés à des courbes étalons de glucose et de xylose.

Les unités d'activité enzymatique sont exprimées en µg/ml de glucide réducteur apparu dans le mélange réactionnel. Les unités peuvent être rapportées au volume de filtrat (culture agitée) au poids sec de mycélium, ou au poids frais des tissus infectés.

2B.2. Mesure de l'activité Endo-PMG, Endo-PG et Endo-Cx

La présence de ces enzymes se traduit d'abord par une rapide baisse de viscosité des substrats à base de pectine, de pectate, ou de carboxyméthylcellulose, car elles hydrolysent les chaînes macromoléculaires au hasard.

1 ml de préparation enzymatique est additionné à 10 ml de substrat (cf *"préparation des substrats"*); les mesures sont effectuées à l'aide d'un viscosimètre à capillaire du type OSWALD plongé dans un bain-marie réglé à 30° ± 0.2 . Si T_o est le temps d'écoulement du milieu réactionnel immédiatement après l'addition de la préparation enzymatique, T_t le temps d'écoulement après t minutes d'incubation, T_e celui de l'eau distillée, on exprime le pourcentage de décroissance du *"flot"* du mélange réactionnel au temps T_t d'après KELMAN et COWLING (1965).

$$RDFT_t = (T_o - T_t) / (T_o - T_e) \times 100$$

L'unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme dont l'action entraîne une réduction de viscosité du substrat de 50 % en 100/mn ($1/T_{50} \times 100$).

Toutefois, si les activités sont de faible intensité, on peut comparer directement les valeurs de P.D.F.T. pour des temps d'incubation plus courts, par exemple une heure. En effet, dans quelques cas, il est difficile d'atteindre le point 0,50 ce qui nécessiterait 24 heures ou davantage.

Cette méthode a l'avantage d'être très sensible. En effet, pour les exo-enzymes il faut une longue incubation de l'enzyme avec son substrat avant d'obtenir une quantité de sucre réducteur appréciable par les méthodes utilisées.

28.3. Mesure de l'activité pectate-lyase (polygalacturonate transéliminase).

La polygalacturonate lyase (trans-éliminase) libère des résidus galacturonyls insaturés (double liaison entre C_4 et C_5) qui donnent une réaction colorée avec l'acide thiobarbiturique, avec une forte absorption vers 547 - 550 nm. les résidus galacturonyls non saturés absorbent également dans l'ultra-violet vers 230 - 235 nm.

L'activité est mesurée par la technique de ALBERSHEIM et al (1960) et de HASEGAWA et NAGEL (1962) modifiée par AYERS et al (1966).

2 ml de préparation enzymatique sont additionnés à 4 ml de substrat. Le mélange est incubé à 30° dans un bain-marie thermostaté pendant 1 à 24 h.

5 ml du mélange réactionnel (substrat dégradé) sont ajoutés à des tubes contenant 3 ml d'acide thiobarbiturique 0,04 M, 1,5 ml HCl 1 N. et 0,5 ml d'eau distillée.

Les tubes sont chauffés pendant 30 mn au bain-marie bouillant, refroidis dans l'eau glacée et centrifugés 20 mn pour éliminer le précipité.

On effectue la même opération avec 5 ml de substrat témoin (substrat + enzyme, sans incubation). On trace le spectre d'absorption du composé rouge formé, par rapport au témoin, ou par rapport à l'eau distillée depuis 480 jusqu'à 580 nm au spectrophotomètre.

L'unité de pectate lyase est déterminée comme étant la quantité d'enzyme qui, dans les conditions expérimentales, catalyse en 3 heures la libération d'une quantité de produits à liaison double telle qu'après la coloration à l'acide thiobarbiturique la densité optique à 550 nm des produits de réaction soit de 0,01.

28.4. Mesure de l'activité pectinemethylestérase (PME)

Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des groupements méthyl-esters des acides pectiniques et des pectines avec formation d'acides pectiques et d'alcool méthylique. La mesure de l'activité de l'enzyme repose sur le dosage de l'augmentation de l'acidité résultant de la déméthylation d'un substrat pectique très méthylé avec formation corrélative de carboxyles libres.

La technique utilisée est celle de KERTESZ (1955) par titration continue.

3 ml de préparation enzymatique sont ajoutés à 20 ml de substrat. Le milieu réactionnel est constamment agité (agitateur GALLEN KAMP).

Le pH est d'abord ajusté au pH-mètre avec précision à la valeur choisie ; on note alors le temps. De la soude 0,01 N est ajoutée pour compenser l'acidité liée à l'activité enzymatique afin de maintenir le pH le plus possible à sa valeur initiale. Il ne doit pas dériver de plus de 0,5 unité sinon la vitesse de réaction n'est plus constante. A cet effet l'indicateur coloré facilite le contrôle de la valeur du pH. Quand la quantité de soude ajoutée est jugée suffisante, on ajuste le pH à sa valeur initiale et on note à nouveau le temps.

Les unités enzymatiques sont alors exprimées comme le nombre de micro-équivalents acides qui apparaissent dans le milieu réactionnel par unité de temps (100 minutes).

28.5. Mesure de l'activité protéolytique

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour la détermination de l'activité protéolytique des enzymes. Il nous a paru préférable dans un premier temps de nous limiter à une méthode semi-quantitative. Nous avons adopté une technique simple sur boîte de Pétri (Cup-plate) inspirée des méthodes de BLACK, PROUTY et GRAHAM (1932) et de THIBODEAU et MACY (1942).

Deux méthodes sont utilisées :

1 - Les milieux 1 ou 2 (cf. préparation des substrats de l'activité enzymatique) sont inoculés par un fragment calibré de mycélium frontal. On laisse le champignon croître à 25°. A intervalles réguliers on mesure le diamètre des cultures ainsi que l'épaisseur de la zone de lyse transparentes qui

apparaît tout autour.

2 - Si les milieux 1 et 2 contiennent du merthiolate de sodium, puissant antiseptique, qui n'affecte pas l'activité enzymatique, on peut disposer à leur surface des disques de papier filtre imbibés de la préparation enzymatique à examiner (0,15 ml) . Après 24 heures d'incubation à 30° les zones de lyse sont mieux révélées en submergeant la surface gélosée par une solution à 5 % d'acide trichloracétique qui précipite les protéines non digérées enzymatiquement.

3. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE GENERALE

3.1. LES POURRITURES MOLLES DES POMMES -

Les pourritures molles sont caractérisées par une perte de cohérence des tissus constitutifs de la chair du fruit. Les cellules se séparent les unes des autres sous l'effet d'une légère pression. Les lésions ont une forme régulière car les tissus présentant une texture uniforme et, de ce fait, le parasite se développe également dans toutes les directions. La périphérie des lésions est bien distincte de celle des tissus sains.

Dans le cas des pourritures molles, il faut tenir compte des faits suivants (WOOD, 1967) :

- certains parasites pénètrent directement à travers la cuticule ;

- d'autres parasites peuvent également pénétrer directement au travers de la cuticule, mais leur propagation dans la plante est ensuite stoppée;

- la plupart des parasites ne peuvent pas franchir la barrière cuticulaire externe ou une assise subérifiée, mais ils envahissent l'hôte à partir des points de discontinuité (lenticelles) de la surface ;

- l'établissement et la propagation d'un parasite actif peuvent être facilités par l'addition d'éléments nutritifs au point d'entrée dans l'hôte (BOMPEIX, 1970) ;

- il est enfin des parasites qui ne peuvent pas envahir l'hôte sauf si les tissus sont blessés.

Dans le cas de nombreuses maladies de pourriture initiées par les blessures, la progression des lésions est liée aux conditions, plus ou moins favorables, à la sécrétion d'enzymes qui dégradent la paroi cellulaire, et à la vitesse de sécrétion de ces enzymes (GOODMAN, KIRALY, ZAITLIN, 1967).

En réalité, la couche la plus externe du fruit est généralement plus résistante aux enzymes pectinolytiques assurant la macération (BOMPEIX, 1972), tandis que les couches profondes sont plus susceptibles. Ceci implique, qu'après blessure , l'initiation des lésions dépend en grande partie non pas de la

croissance du parasite au point d'entrée, mais de sa croissance liée à la sécrétion des enzymes qui dégradent la paroi cellulaire, ceci ne pouvant être réalisé tant que le champignon n'a pas la possibilité de dégrader activement les composés pectiques.

Le rôle important des blessures est donc de permettre au champignon d'atteindre des zones plus susceptibles, de procurer les éléments nutritifs nécessaires à la croissance très active du champignon, d'offrir les substances spécifiques qui induisent la synthèse des enzymes capables de dégrader les substances insolubles de la paroi cellulaire. Une fois cette synthèse commencée, le processus devient alors cumulatif et provoque une rapide extension des lésions.

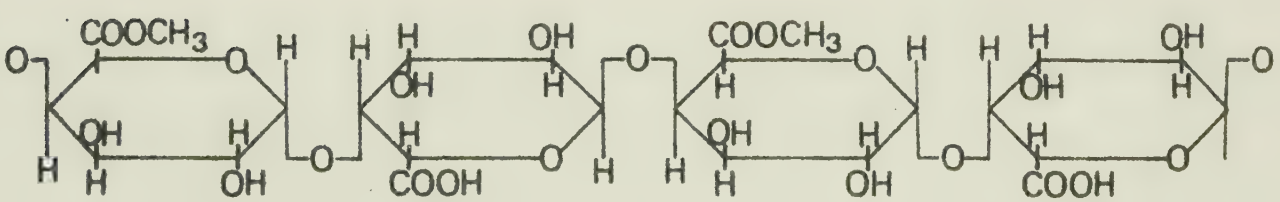
3.2. CONSTITUANTS CHIMIQUES DES PAROIS CELLULAIRES -

32.1. Composés pectiques

Ce sont des glucides complexes qui se trouvent dans les plantes généralement dans une structure amorphe et qui contiennent une grande proportion de molécules d'acides galacturoniques liés en α -1 - 4 que l'on suppose être disposées en chaînes. Selon DOESBURG (1965) on distingue :

1 - Les acides pectiques : il s'agit de composés pectiques constitués essentiellement d'acides polygalacturoniques colloïdaux (5 à 100 unités d'acide D - galacturonique).

2 - Les acides pectiniques : ce sont des acides polygalacturoniques colloïdaux (100 à 200 unités) contenant une forte proportion de groupements carboxyles méthylés.



Fragment d'une chaîne d'acides polygalacturoniques partiellement méthylée (acides pectiniques). D'après DOESBURG(1965)

3 - Pectines : on appelle pectines des composés pectiques presque complètement estérifiés par le méthanol.

4 - Protopectines : ce sont les composés pectiques insolubles dans l'eau, possèdant un poids moléculaire élevé, à partir desquels sont produits les composés pectiques solubles. La structure des protopectines est encore mal connue. On a supposé qu'elles sont formées par l'association étroite de chaînes polygalacturoniques entre elles et peut être avec de la cellulose et des hémicelluloses (JOSLYN, 1962). On pense par ailleurs que ces liaisons peuvent faire intervenir le calcium, réunissant les groupes carboxyles. Il est un fait que la présence d'ions Ca^{++} rend insolubles les pectines à faible degré de méthylation. Enfin DOESBURG (loc.cit.) pense qu'en plus de ces liaisons chimiques, il existe des liaisons physiques de faible énergie entre les macromolécules de pectines ou bien entre ces macromolécules et les autres polymères des membranes cellulaires.

32.2. Evolution des composés pectiques au cours de la maturation

Peu de travaux ont porté sur les variations des composés pectiques des pommes pendant leur développement sur l'arbre. On peut citer les travaux de HULME (1958), de DAVIGNON (1961) et de ULRICH et al (1958 a et b). Ces travaux ont permis d'affirmer que la protopectine diminue tandis que la pectine soluble varie peu pendant la période de formation du fruit jusqu'au moment favorable pour la cueillette. Cette constance est expliquée par un équilibre entre la croissance du fruit et la formation des composés pectiques. Après cette période, la maturation est, entre autres phénomènes, caractérisée par une chute en protopectine et une augmentation corrélative de pectine soluble. La sénescence est marquée par une destruction de la pectine en acides pectiniques puis en acides pectiques.

Il a été suggéré que la solubilisation des protopectines pourrait être provoquée par une action enzymatique. Cependant l'absence d'une telle activité dans les pommes saines exclut cette hypothèse.

DOESBURG (1965) suppose l'intervention d'échanges cationiques dans les cellules, la solubilisation des composés pectiques est accompagnée par des échanges de calcium et par une diminution du pH des parois cellulaires. Des relations entre les concentrations en Ca^{++} et en Mg^{++} et la fermeté des fruits ont pu être établies.

KERTESZ (1951) pense que des mécanismes non enzymatiques peuvent expliquer la solubilisation des composés pectiques, l'oxydation des pectines des membranes cellulaires par l'acide ascorbique ou par des peroxydases en aérobiose entraînerait le ramollissement des fruits.

ULRICH et MIMAULT (1958) ont établi un intéressant parallélisme entre les courbes d'activité respiratoire et les courbes d'apparition des pectines solubles pendant la maturation ; par ailleurs l'effet stimulant de certains facteurs : température, éthylène, blessures ou l'effet dépressif d'une atmosphère pauvre en oxygène jouent aussi bien sur l'intensité respiratoire que sur la formation des composés pectiques.

32.3. Cellulose

Les celluloses sont des polymères non ramifiés de molécules β - glucopyranose groupées entre elles par des liaisons β,1,4. Il existe un certain nombre de types de celluloses définis essentiellement par leur degré de polymérisation, la longueur de leur chaîne et leur constitution en fibrilles.

Tableau (1) - Classification des types de celluloses (adapté de FRAY-WYSSLING et MUHLETALER 1965) dans les parois cellulaires (PILET, 1971)

Types	Synonymes	Degré de polymérisation	Longueur de la chaine A°	Formation de fibrilles
cellodextrine	-	1 - 10	5 - 50	Néant
β-cellulose	Hémicolloïde cellulosique	10 - 100	50 - 500	Faible
cellulose régénérée	Mésocolloïde cellulosique	100 - 500	500 - 2 500	Forte
α - cellulose	cellulose native	500 - 10 000	2 500 - 50 000	Très forte

La cellulose la plus courante, celle qui est la base de l'architecture des parois, est l'α cellulose. On estime à la suite des premiers travaux de MEYER et MISCH (1937), puis de FREY WYSSLING (1955) qu'une bonne partie de l'α cellulose des parois squelettiques existe sous forme de cristaux justaposés. L'élément de base de chaque cristal serait une molécule de cellobiose.

Pour interpréter certaines propriétés de la cellulose en rapport avec les polysaccharides de constitution des parois, LAMPORT (1970) imagine que les microfibrilles de cellulose sont caractérisées par deux zones distinctes, la zone cristalline, au niveau de laquelle les microfibrilles sont parfaitement arrangées, et la zone amorphe où les microfibrilles ne sont plus nécessairement parallèles et où une certaine désorganisation peut être relevée.

La présence de la cellulase d'origine endogène a sollicité l'attention de nombreux chercheurs. La cellulose a été regardée comme étant la substance squelettique de la paroi qui est déposée irréversiblement, et qui ne peut pas être dégradée par des enzymes endogènes. Ceci peut être vrai dans les tissus des plantes adultes, cependant dans les cellules méristématiques l'hydrolyse et la resynthèse de la cellulose dans les parois primaires ont été discutées comme étant les facteurs intervenant dans leur plasticité.

REESE et MANDELS (1963) ont examiné de nombreuses plantes (41 espèces) pour déterminer la présence de la cellulase. Six espèces seulement ont donné un résultat positif. NORKRANS (1963) a conclu que si la cellulase intervient dans la plasticité des cellules en voie de différentiation, elle doit être présente dans toutes les plantes supérieures à un stade de leur développement.

L'absence de la cellulase dans les pommes a été notée par plusieurs chercheurs (ULRICH, 1957 ; EDNEY, 1964 ; BOMPEIX, 1972).

Cependant leur présence a été montrée dans les tomates saines (DICKINSON et Mc COLLUM, 1964).

32.4. Hémicelluloses

Elles accompagnent en général les substances pectiques dans la matrice, et on pense qu'elles pourraient former un mélange avec elle.

Elles peuvent être extraites de la membrane cellulaire, après élimination des substances pectiques par des solutions d'hydroxyde de sodium ou de potassium, qui n'affectent pas l'α-cellulose.

Les hémicelluloses constituent un groupe de polymères formé de plusieurs monosaccharides, ou de leurs dérivés (D-glucose, D-galactose, D-mannose, L-arabinose, D-xylose, etc...). En général, un ou deux types de ces composés prédominent donnant ainsi le xylane, le mannane, l'arabane, l'arabogalactane

et glucane ... . Le xylane, qui est probablement l'un des types les plus importants d'hémicellulose, a retenu notre attention. La littérature concernant la structure des xylanes a été revue par ASPINALL (1959) qui admet qu'il s'agit d'un polymère de β-1,4 xylopyranose. Les chaînes latérales attachées en position 2 ou 3 sont habituellement constituées par de l'acide L-glycuronique, par du L-arabinose, ou par de l'acide 4-O méthyl L-D glycuronique. Elles peuvent aussi être constituées par un mélange de ces trois substances.

32.5. Protéines

C'est grâce aux recherches de BISHOP et al.(1958) et KIVILAAN et al. (1959) que l'existence des protéines dans les parois cellulaires paraît certaine, et leur taux relatif élevé, alors même qu'il est d'environ dix fois plus faible dans la cellule totale.

LAMPORT (1965) constate que chaque groupe des constituants des parois est accompagné de protéines dont la concentration relative semble dépendre de la nature des substances avec lesquelles ces protéines sont associées. DAUGAL (1960) constate que l'hydroxy-proline est l'acide aminé le plus abondant parmi ceux qui constituent la protéine des membranes squelettiques. OLSON (1964) relève que cette protéine, riche en hydroxy-proline, serait associée à de l'arabino-galactane. Ce polysaccharide est encore mal connu bien que l'on sache que sa structure de base correspond à des chaînes ramifiées de β-D galactose (liaison 1-3 et 1-6) sur lesquelles viendrait se fixer l'arabinose. L'hydrolyse de ce complexe donnerait une hydroxy-proline arabinoside que MILLER (1968) a mis en évidence dans les cellules de *Sphaerocarpus donnelli* AUST.

Cette association de la protéine membranaire à des polysaccharides est la raison des controverses sur l'existence de protéines dans les parois, car beaucoup de chercheurs, en réalisant des extraits de polysaccharides des parois, ont souvent pris les composés qui constituent l'essentiel de l'extensine (protéine membranaire) pour des restes de substances pectiques ou d'hémicelluloses (LAMPORT, 1969).

3.3. MODE D'ACTION DES ENZYMES SUR LES PAROIS CELLULAIRES

33.1. Enzymes pectinolytiques

Plusieurs enzymes sont impliquées dans la dégradation des composés pectiques.

. Pectinemethylestérase (P.M.E.)

On l'appelle aussi pectinestérase, pectase, pectine-méthoxylase, pectine déméthoxylase.

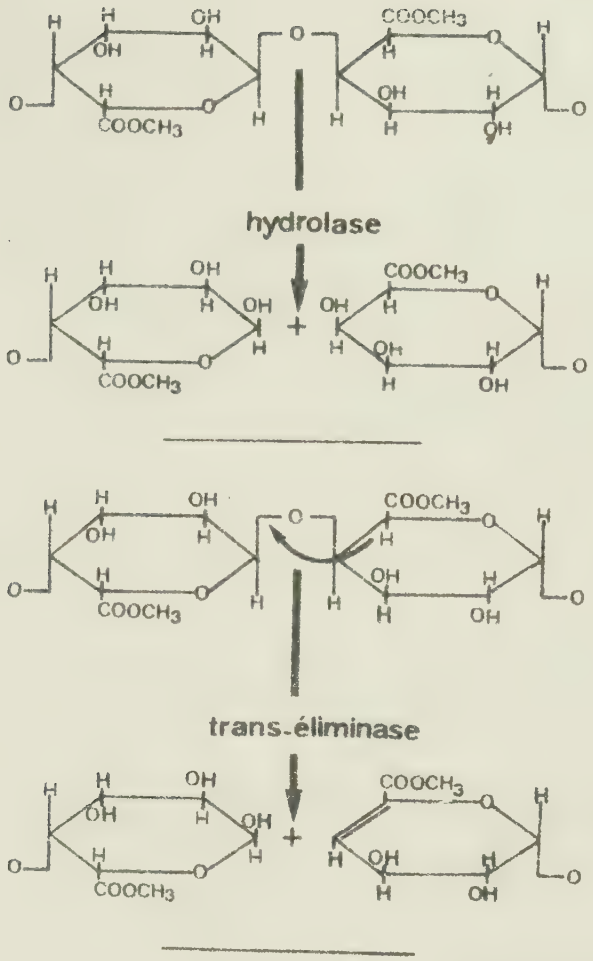
Elle produit, à partir des acides pectiniques, des acides pectiques ou des acides pectiniques plus faiblement méthylés, en libérant du méthanol. La PME est d'une remarquable spécificité . Elle semble hydrolyser les groupements carboxyles estérifiés en agissant de proche en proche le long de l'énorme chaîne polygalacturonique (SCHULTZ et al., 1945). Leur présence est presque universelle dans tous les fruits.

Mode d'action de la PME d'après SOLMS et DEUEL (1945)

Bien que l'action de cette enzyme n'intervienne pas sur la longueur de la chaîne, elle entraîne certainement des modifications dans les propriétés des pectines (solubilité - réactivité, etc...)

. Pectines-glycosidases et lyases

Ces enzymes entraînent la rupture des liaisons α-1,4 glycosidiques des acides pectiques et pectiniques, soit par un mécanisme d'hydrolyse, soit par un mécanisme de transélimination.



Elles sont classées selon le schéma de DEMAIN et PHAFF (1957) modifié par BATEMAN et MILLAR (1966) en huit types d'activités :

A - Rupture des liaisons α-1,4 glycosidiques des composés pectiques par un mécanisme d'hydrolyse : (poly α-1,4 galacturonide glyconohydrolase)

1 - Enzymes attaquant le substrat au hasard :

a - Enzyme agissant préférentiellement sur les acides pectiniques (Endo-polyméthylgalacturonase) Endo PMG

b - Enzyme agissant préférentiellement sur les acides pectiques (Endo-polygalacturonase) Endo PG

2 - Enzymes attaquant le substrat à l'extrémité de la chaîne :

a - Enzyme agissant préférentiellement sur les acides pectiniques (Exo-polyméthylgalacturonase) Exo-PMG

b - Enzyme agissant préférentiellement sur les acides pectiques (Exo-polygalacturonase) Exo-PG

B - Rupture des liaisons α-1,4 glycosidiques des composés pectiques par un mécanisme de transélimination (poly α-1,4 galacturonide-lyase)

1 - Enzymes attaquant le substrat au hasard :

a - Enzyme agissant préférentiellement sur les acides pectiniques (Endo-pectineméthyl-transéliminase) Endo PMTE

b - Enzyme agissant préférentiellement sur les acides pectiques (Endo-polygalacturonate-transéliminase) Endo PGTE

2 - Enzymes attaquant le substrat à l'extrémité de la chaîne :

a - Enzyme agissant préférentiellement sur les acides pectiniques (Exo-pectineméthyl-transéliminase) Exo PMTE

b - Enzyme agissant préférentiellement sur les acides pectiques (Exo-polygalacturonate -transéliminase) Exo PGTE

33.2. Enzymes cellulolytiques

La dégradation de la cellulose par l'intermédiaire des enzymes est un sujet qui a fait l'objet de vives controverses.

REESE et coll. (1950) utilisant la technique d'électrophorèse considèrent que la dégradation de la cellulose se fait par étapes, et nécessite au moins l'action de deux enzymes C_1 et C_x

	C_1		C_x		β-glucosidase	
Cellulose native = α celluloses	→	Chaînes cellulosiques plus courtes	→	petites molécules solubles (cellobiose)	→	glucose

MARSH et al. (1953) ont démontré la présence d'une enzyme (swelling factor) qui augmenterait l'accessibilité des microfibrilles aux enzymes et faciliterait l'hydrolyse ultérieure.

THOMAS et WHITAKER (1958) supposent que l'apparente multiplicité de la cellulase est un artéfact qui est dû à la formation de complexes entre une seule enzyme et plusieurs polysaccharides différents qui migrent à des vitesses différentes en électrophorèse.

Selon NORKRANS (1963) PETTERSON et al. (1963) COWLING (1965), il existe plusieurs enzymes responsables de l'hydrolyse des chaînes cellulosiques. Le résultat de cette hydrolyse est la formation de cellobiose, et d'autres oligosaccharides (cellotriose - cellotétraose ...) aussi bien que de polysaccharides à chaînes courtes. PETTERSON et al. (Loc. cit.) ont caractérisé deux types de cellulases dans la culture du *Polyporus versicolor*, qui diffèrent par leur poids moléculaire, l'une a un PM de 11 000, l'autre de 51 000.

Ils ont remarqué que l'enzyme qui a le poids moléculaire le plus faible attaque les chaînes longues, tandis que l'autre attaque les chaînes d'oligosaccharides.

Comparé avec leur action très lente sur les α celluloses, les agents pathogènes des végétaux dégradent les dérivés solubles de la cellulose avec une plus grande rapidité. C'est ce type de substrat appelé carboxyméthylcellulose (CMC en abrégé) qui est le plus utilisé par la plupart des chercheurs dans l'étude des enzymes cellulolytiques. On peut distinguer les enzymes C_1 et C_x. Seule l'enzyme C_x dégrade les cellulose solubles.

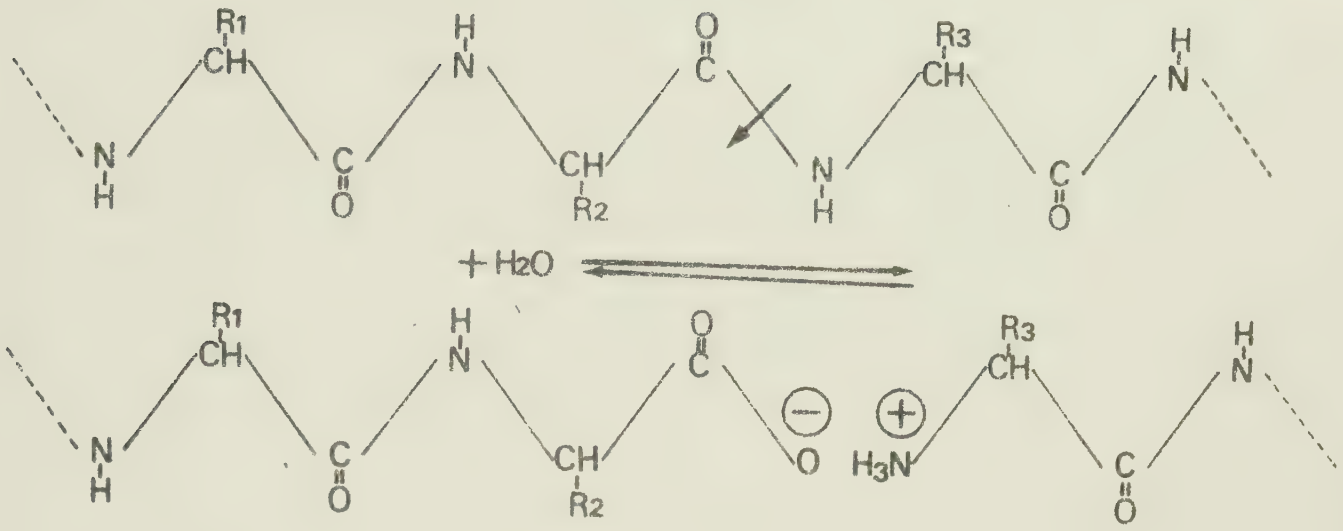
Cette enzyme peut agir soit au hasard (Endo-C_x) produisant des chaînes de plus en plus courtes, soit à l'extrémité de la chaîne (Exo-C_x) libérant des sucres simples.

COWLING (1965) suggère que certains caractères structuraux des fibrilles de cellulose déterminent leur susceptibilité à l'égard des enzymes : 1) l'humidité - 2) le volume et la diffusibilité des molécules enzymatiques en relation avec le volume et la propriété de la surface capillaire entre les microfibrilles de cellulose - 3) le degré de polymérisation - 4) la nature des substances associées à la cellulose, et la nature de cette association. Selon le même auteur chaque caractère influe sur l'accessibilité de la cellulose aux enzymes. C'est finalement le premier contact direct physique de l'enzyme avec le groupement hydroxyle de la cellulose qui est nécessaire pour déclencher l'hydrolyse.

Le sophorose pourrait être un inducteur de la cellulase mais il semble que c'est le cellobiose à très faible concentration qui semble le véritable inducteur (CHARPENTIER, 1968).

33.3. Enzymes protéolytiques

Les protéases et les amylases sont probablement les hydrolases les plus importantes. Les protéases pourraient être nommées CN hydrolases car elles attaquent les liaisons C-N dans les chaînes peptidiques.



Généralement la rupture de la liaison est la plus fréquente.

Selon leur mode d'action spécifique, les protéases sont classées en deux groupes (KARLSON, 1969) :

1 - Les Endo-peptidases qui attaquent les protéines au hasard le long de la chaîne ; elles n'attaquent pas généralement l'extrémité de la chaîne. Elles tendent à agir sur les protéines et les polypeptides à PM élevé, pour celà elles sont nommées aussi des protéinases.

2 - Les Exo-peptidases dont le nom vient du fait qu'elles attaquent exclusivement les extrémités des chaînes peptidiques. Elles libèrent ainsi seulement des acides aminés terminaux. Dans ce groupe, on peut faire la distinction entre les carboxypeptidases qui attaquent le radical carboxyle terminal, et les aminopeptidases qui attaquent le radical amine terminal. Ces enzymes agissent préférentiellement sur les substrats à courtes chaînes de protéines, d'oligopeptides et de polypeptides.

A l'opposé de la plupart des enzymes, les protéases ne sont pas spécifiques pour certains substrats (une protéine particulière) mais elles sont spécifiques pour certains caractères structuraux des chaînes peptidiques (les protéines dénaturées sont hydrolysées plus facilement que les protéines naissantes).

3.4. ROLE DES ENZYMES DANS LA GENESE DES POURRITURES MOLLES -

En travaillant sur le *Sclerotinia libertiana* FCK. et en utilisant la sève élaborée des plantes infectées (Racines de carotte), DE BARY (1886) fut le premier à démontrer la présence d'une substance thermolabile qui provoque la désorganisation des tissus de l'hôte. DE BARY a conclu que la dissolution des parois cellulaires était provoquée par une enzyme produite par le champignon. Bien que la nature de l'action toxique soit mal déifnie, l'observation de DE BARY a fourni une première conception de la physiologie du parasitisme des champignons.

WARD (1888) en travaillant sur une maladie du Lilas provoquée par un *Botrytis sp.* a confirmé et amplifié le travail de DE BARY. Il a observé la pénétration de l'hyphe mycélien à travers la paroi cellulaire de l'hôte, et, a conclu qu'une enzyme cellulolytique était responsable de la dissolution de la paroi. Une solution aqueuse de cette enzyme obtenue à partir de filtrat de culture a produit les mêmes symptômes que ceux provoqués par le champignon ; autrement dit, WARD a montré l'existence d'une enzyme libérée des cellules vivantes qui peut provoquer une réaction spécifique in vitro.

BROWN (1915-1917) a montré d'une façon décisive que les enzymes pectinolytiques de *B. cinerea* sont un des facteurs responsables de la macération des tissus. L'enzyme (ou les enzymes) est présente dans les extraits de spores aussi bien que dans le mycélium, et, le filtrat de culture.

Toutes les préparations enzymatiques obtenues par BROWN, provoquaient non seulement la séparation des cellules, mais aussi la mort du protoplasme.

Etant donné que l'action de macération ainsi que celle qui provoque la mort du protoplasme ne peuvent être ni séparées ni dialysées, et sont en même temps thermolabiles, BROWN a conclu que dans le cas de *B.cinerea* ; la mort et la macération sont provoquées par une enzyme qu'il a appelée "protopectinase".

Des études détaillées sur la physiologie du parasitisme de *Rhizopus nigricans* sur patate douce, ont révélé que les enzymes pectinolytiques secrétées par cet organisme sont responsables de la pourriture des tissus (HARTER et WEIMER, 1921-1923).

La contribution la plus significative dans ce domaine a été fournie par les travaux de BROWN, WOOD, et leurs collaborateurs effectués au Collège Impérial de l'Université de Londres (BROWN, 1955, WOOD, 1955).

La démonstration de la formation des enzymes pectinolytiques dans les tissus de l'hôte envahis par les champignons de la pourriture molle est un fait essentiel dans l'épreuve ultime montrant que ces enzymes sont responsables de la macération des tissus. L'absence apparente d'activité pectinolytique dans les extraits de pomme envahis par des organismes tels que le *Sclerotinia fructigena* (PERS.) ADERH. et RUHL., *S. laxa* (EHRENB.) ADERH. et RUHL. et *Botrytis cinerea*, a posé un problème très intéressant dans l'analyse de la relation qu'il peut y avoir .

Dans ce cas la perte d'activité a été expliquée par la formation de substances inhibitrices libérées des cellules mortes après la macération (COLE, 1956).

Les enzymes pectinolytiques du *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) DE BY. qui provoquent une pourriture molle sur un certain nombre de fruits et de légumes frais ont été caractérisées par WALKER (1957). Ce champignon secrète in vitro de la PME et de la PG à bas pH. L'activité de ces enzymes est inhibée par des extraits de tissus sains de Pomme de terre et d'Oignon.

Il est maintenant bien établi que certains champignons de pourritures molles, produisent de la cellulase (REESE et LEVINSON, 1952, KOHLMEYER, 1956, WALLACE et al., 1962). Un champignon commun de la pourriture molle, le *Sclerotium rolsfii* SACC. qui est capable d'attaquer les tissus mûrs aussi bien que les tissus verts, est très cellulolytique.

Il est maintenant évident que la dégradation de la cellulose ainsi que la dégradation des substances pectiques représentent une phase essentielle de la désintégration tissulaire provoquée par beaucoup de champignons de pourritures molles

La manière exacte selon laquelle les cellules sont tuées par les bactéries et les champignons pathogènes n'est pas encore connue.

La conception selon laquelle la mort et la macération des cellules peuvent être attribuées aux enzymes pectinolytiques a de nombreux partisans (BROWN, 1955 ; TRIBE, 1955 ; FUSHTEY, 1957 ; BATEMAN et MILLAR loc.cit.).

En effet le traitement du filtrat de culture par la chaleur détruit l'activité de macération et le principe mortel. Tous les essais entrepris pour séparer les effets de macération de ceux qui provoquent la mort des cellules n'ont pas réussi.

Il est difficile de comprendre comment les enzymes pectinolytiques peuvent à elles seules agir comme un poison du protoplasme vivant. Elles peuvent probablement rendre les cellules plus susceptibles à d'autres métabolites toxiques en les rendant accessibles à ceux d'entre eux qui ne peuvent pas passer librement dans les cellules intactes.

Une autre possibilité sans évidence directe, est que les cellules sont tuées avant que l'enzyme n'agisse. Dans ce cas, les enzymes pectinolytiques ne jouent pas un rôle dans la mort des cellules.

Si les enzymes pectinolytiques ne peuvent être vraiment la cause de la mort des cellules, la nature de l'entité toxique reste encore à déterminer.

Une interprétation plus récente concerne l'altération de la nature semi-perméable de la membrane plasmique. Dans le cas des pourritures molles, l'exosmose à partir des cellules de l'hôte indique ordinairement que la membrane plasmique est touchée.

La perte d'eau et de métabolites cellulaires peut être fatale. La désorganisation de la membrane plasmique permet aussi un libre mouvement des différentes molécules à l'intérieur de la cellule en permettant le contact par exemple, d'enzymes avec leur substrat correspondant, normalement séparées dans la cellule saine.

3.5. ROLE DES ENZYMES DANS LE CAS SPECIAL DES POURRITURES DE POMME -

DAVISON et WILLIAMAN (1927) ont utilisé plusieurs milieux de culture à base de fragment de fruit, pour cultiver le *Sclerotinia fructigena* (PERS.) ADERH. et RUHL., et le *S. cinerea* (BON.) SCHROET. Ils n'ont pas réussi à mettre en évidence le principe de macération, mais ont montré cependant la présence d'une enzyme qui augmente le pouvoir réducteur d'une solution de pectine après incubation de 24 heures, et l'ont appelée "pectinase" bien que ses caractères se rapprochent d'une polygalacturonase du type exo.

VASUDEVA (1930) a ensemencé le *Botrytis allii* MUNN. , sur un milieu de culture à base de jus de pomme seul, ou avec addition d'une source d'azote (asparagine ou nitrate de potassium à 0,4 %). Il a trouvé que l'activité de macération était très basse. En revanche, le broyat du mycélium sec dans l'eau obtenu à partir de la culture sur jus de pomme et azote contient une quantité appréciable de "macerating enzymes". Il a conclu que l'addition d'une source azotée au jus de pomme (qui en contient peu) accélère la formation des enzymes.

BRAY (1938) a montré la présence d'une activité de macération dans le jus des fragments de pommes pourries par le *B. cinerea.*

COLE (1956), dans un travail concernant les pourritures de pommes dues au *Sclerotinia fructigena* , *S. laxa* (WORM.) HARRISON , et *Botrytis cinerea,* a montré en examinant les substances pectiques qu' :

- il y a une baisse des substances pectiques totales ;
- " " " " " " " solubles dans l'eau ;
- " " " " " " " insoluble " ".

In vivo peu ou pas d'activité pectinolytique a été détectée, tandis qu'in vitro, les trois champignons se sont montrés capables de secréter ces enzymes. Il a noté par ailleurs que l'addition de jus de pomme dans le milieu du culture fait baisser cette activité.

Trois champitnons (*Botryosphaera ribis* GROSS. et DUGG., *Glomerella cingulata* (STON.) SPAULD et SCHRENK et *Physalospora obtusa* (SCHW.) CKE qui parasitent les pommes, ont été étudiés pour leur capacité de produire de la cellulase (HUSAIN et DIMOND , 1958). Tous les trois produisent des quantités significatives de la cellulase dans leurs cultures et dégradent différents types de celluloses, aussi bien que des dérivés substitués de ces dernières. En 1962 KUC et WILLIAMS ont montré que les tissus de pommes parasités par ces champignons ont une grande activité protéolytique, mais elle est indécelable dans les tissus avoisinants et nulle dans les tissus sains.

COLE et WOOD (1961) comparant deux groupes différents de pourritures sur pomme : pourritures molles provoquées par le *Botrytis cinerea* et le *Penicillium expansum,* pourritures fermes provoquées par le *Sclerotinia fructigena* et le *Pyrenochaeta furfuracea* , ont trouvé que les agents de pourriture ferme causent une baisse de 10 à 20 % de la pectine totale, ce chiffre monte jusqu'à 70 % dans le cas des pourritures molles . La portion

de la pectine insoluble dans l'eau mais soluble dans les acides dilués est peu influencée par les agents de pourriture ferme, mais dégradée jusqu'à 70 % dans le cas de pourriture molle. Examinant l'activité enzymatique de ces champignons dans l'extrait de pourriture, ils ont montré la présence d'une PME très active, le *P. expansum* est le plus actif pour la secrétion de PG et pour l'activité de macération. Mais aucun ne secrète de la cellulase. In vitro chacun des champignons produit du PG, PME, et des enzymes de macération sur milieu synthétique, l'addition de jus de pomme au milieu synthétique inhibe la secrétion de PG, la substance responsable a été identifiée comme étant la leuco-anthocyanine qui se transforme en un autre composé après action de la polyphénol-oxydase. Ils ont en outre apprécié le contenu phénolique dans les tissus pourris par les différents champignons, ce dernier boisse dans le cas de *B. cinerea* et *Sclerotinia fructigena*, mais dans le cas de *P. expansum* il est aussi élevé que dans les tissus sains.

EDNEY (1964) a mis en évidence la présence d'une activité pectinolytique in vitro par le *Pezicula alba* et le *Pezicula malicorticis* , qui est plus élevée dans le deuxième cas, mais il n'a pas pu montrer la présence d'une activité cellulolytique. En examinant les substances pectiques dans les pommes parasitées, il a remarqué qu'il y a une baisse de la pectine totale de 28 % dans le cas de *P. malicorticis* et 18 % dans le cas de *P. alba* .Pour la portion de pectine insoluble dans l'eau la baisse atteint 37 % dans le cas de *P. malicorticis* et 27 % en ce qui concerne le *P. alba*.

POMPEIX (1972) a montré que le *Pezicula alba* et *P. malicorticis* sont capables de synthétiser in vivo des enzymes de lyse des parois cellulaires des pommes : C_x , PME, PG, PMG , et protéase. Il souligne que les activités enzymatiques des deux champignons sont plus intenses, lorsque les fruits parasités évoluent en atmosphère contrôlée (3 % O_2, 5 % O_2 , 92 % N_2) plutôt que dans l'air entre 1° et 2°, bien que le comportement relatif des deux parasites l'un par rapport à l'autre soit identique pour les deux conditions d'atmosphère.

Selon cet auteur, on ne peut pas établir de corrélation entre l'activité cellulolytique et le pouvoir pathogène, il en est de même pour la PME produite activement par les deux champignons, mais à des concentrations proches, car les deux espèces ont une activité C_x et PME très importante au niveau de la périphérie des lésions. En revanche il a trouvé que l'endo-PG, et surtout l'endo-PMG sont beaucoup plus importantes pour le

P. malicorticis que pour le *P.alba*. En outre les activités sont plus intenses au centre des lésions qu'à leur périphérie. Il a noté aussi que l'activité protéolytique du *P. malicorticis* était plus grande que celle du *P.alba* dans certaines conditions.

Il a conclu que les activités PMG et protéolytique semblent être les plus importantes en regard du pouvoir pathogène. En outre l'adjonction de ces enzymes au niveau des points de pénétration stimule la pathogénèse, alors même que cellulases et PME n'ont pas d'effet.

Dans un travail antérieur (BOMPEIX, 1970) cet auteur a montré que les mécanismes de régulation de la synthèse d'enzymes sont perturbés si on inocule des cultures pures de tissus de fruit; à cet effet, il a constaté que la teneur en PMG est 50 à 60 fois plus grande pour *P.malicorticis* que pour *P.alba* , et seulement 3 à 4 fois plus importante sur fruit. En revanche, les concentrations en Endo C_x restent à peu près dans le même ordre de grandeur.

SCHULZ (1972) étudiant la secrétion enzymatique de *P. malicorticis* in vitro sur différents milieux de culture, a aussi montré la présence d'une endo-PG, endo-PMG et endo C_x. Il a mis en doute la sécrétion de PME, PTE, exo-PG et exo-PMG par ce champignon.

L'analyse des tissus sains a permis de mettre en évidence l'absence d'activité enzymatique (sauf la PME), ou du moins leur présence à des concentrations non mesurables" bien qu'une publication récente de GEYPENS et al. (1971) note la présence d'endo-PG et endo-C_x à des concentrations moins importantes dans les tissus de pommes saines"Golden delicious" que dans les extraits de pommes parasitées par le *Stemphylium botryosum*, WALLK".

Il s'agit donc de vérifier la présence des différentes enzymes in vivo, in vitro, dans l'hôte sain et pour chaque parasite. Les conclusions des auteurs précités étant en effet parfois contradictoires. En outre, notre but est aussi d'établir des comparaisons entre les pouvoirs pathogènes et les productions enzymatiques.

4. ACTIVITES ENZYMATIQUES "IN VITRO"

4.1. ENZYMES CELLULOLYTIQUES

Beaucoup de champignons se sont révélés, en culture pure, capables d'hydrolyser les dérivés solubles de la cellulose mais peu d'entre eux ont la capacité d'hydrolyser la cellulose insoluble.

Nous avons donc, tout d'abord, testé la capacité des champignons expérimentés à hydrolyser la cellulose insoluble pour s'assurer de la présence de la série complète des cellulases. Ensuite nous avons étudié la cinétique de ces enzymes sur la CMC en culture agitée, car c'est le substrat utilisé par la plupart des chercheurs.

41.1. Culture sur cellulose insoluble

5 ml de milieu minérale de RICHARDS ajustés à pH 4,0 sont coulés sur deux couches de papier filtre dans une boîte de Pétri (dix boîtes pour chaque champignon). Après stérilisation à 120° pendant 30 mn, les boîtes sont ensemencées avec un fragment calibré de mycélium frontal provenant d'une préculture sur maltéa. On a mesuré l'accroissement de diamètre des colonies entre le 4ème et le 6ème jour après l'ensemencement, et on l'a comparé avec un témoin cultivé sur milieu à la base de l'extrait de malte.

A - Résultats

Tableau n°(2): Croissance sur cellulose insoluble par rapport au témoin

Parasites	croissance sur cellulose insoluble / croissance sur milieu à la base d'extrait de malte.
A. tenuissima	0,50
B. cinerea	0,44
C. herbarum	1,40
P. expansum	0,06
P. alba	0,75
P. malicorticis	2,50

Nous constatons que les champignons expérimentés croissent plus ou moins bien sur cellulose insoluble. A l'exception de *C. herbarum*. Les parasites latents croissent mieux que les parasites de blessures. Parmi ces derniers le *B. cinerea* utilise mal la cellulose insoluble pour sa croissance.

B - Conclusion

Nous pouvons dire que les 6 champignons peuvent donc être considérés comme réellement cellulolytiques, et possèdent vraisemblablement la série complète des cellulases nécessaire à la dégradation de la cellulose insoluble.

41.2. Culture sur CMC en milieu agité

Les cultures agitées sont réalisées en boîtes de Roux de 1 litre, contenant 100 ml de milieu de culture. Ce dernier est constitué de la solution minérale de RICHARDS, avec pour seule source de carbone la carboxyméthylcellulose à 1 % (cf. techniques). Deux séries de culture sont faites, l'une à pH 5,3, l'autre à pH 4,0. 4 prélèvements stériles de 4 ml sont effectués : 1 ml est destiné au dosage des groupements réducteurs ; 1ml est destiné au dosage de l'endo C_x ; 2 ml servent de témoin.

Ces prélèvements contribuent évidemment à réduire légèrement la quantité de milieu de culture disponible, mais nous verrons que l'ordre de grandeur des variations observées est beaucoup plus important ; notre objectif étant d'apprecier la cinétique générale de la secrétion enzymatique par les parasites.

En outre, les comparaisons entre ces derniers ne sont pas modifiées; toutes les cultures étant traitées dans les mêmes conditions.

A - Résultats

Nos résultats montrent que les champignons étudiés synthétisent tous les enzymes cellulolytiques endo-C_x et exo-C_x. Ces enzymes peuvent être libérées du mycélium puisqu'il est possible de les mettre en évidence dans le milieu de culture.

En prenant comme critère la concentration finale de l'enzyme dans le filtrat après 13 jours d'incubation, le tableau (3) nous permet de constater que les parasites de blessures sont moins actifs dans la dégradation de la CMC que les parasites latents. Les différences sont peu significatives. Le *B. cinerea* s'avère le moins actif.

Tableau n° (3) : Secrétion d'endo-cellulase en fonction du temps.

Parasite	pH	PDFT/ml de filtrat après incubation 50 mn.			
		3 jours	6 jours	10 jours	13 jours
A. tenuissima	4.0	8	44	58	76
	5.3	38	62	68	72
B. cinerea	4.0	5	32	57	59
	5.3	22	42	56	62
C. herbarum	4.0	6	10	52	78
	5.3	7	22	50	76
C. expansum	4.0	6	20	67	70
	5.3	53	59	61	72
P. alba	4.0	7	43	74	100
	5.3	4	34	100	100
P. malicorticis	4.0	8	79	83	89
	5.3	12	14	72	75

Le pH plus élevé favorise uniquement, chez les parasites de blessures une plus rapide sécrétion Endo-C_x que chez les parasites latents (cf.tableau (3)). La cinétique de la sécrétion enzymatique dans le cas de ces derniers ne semble pas être influencée par la variation du pH, car si nous considérons la sécrétion d'Endo et Exo-C_x au cours du temps (cf. tableau (3) et (5)), nous constatons que l'activité enzymatique des parasites de blessures à pH 5.3 est, en général, très intense vers le troisième jour et plus spécialement pour le *P. expansum*, *A. tenuissima*, et *B. cinerea* . Cette activité progresse ensuite très lentement. En revanche à pH 4.0, l'activité est plus faible au début de la culture

puis elle s'accélère rapidement à partir du 6ème jour (cf. figures 1 et 2)

Nous constatons une évolution inverse de la précédente pour les deux parasites latents, et plus spécialement pour le *P. malicorticis*.

Tableau (4) : Activités Exo-C_x

Parasite	pH	U.E./ml	U.E/mg P.S
A. tenuissima	4.0	160	275
	5.3	77	53
B. cinerea	4.0	85	39
	5.3	125	98
C. herbarum	4.0	148	188
	5.3	78	156
P. expansum	4.0	65	41
	5.3	66	98
P. alba	4.0	60	58
	5.3	164	211
P. malicorticis	4.0	180	190
	5.3	125	186

En classant les parasites de blessures, par ordre d'activité endo -C_x décroissant, nous trouvons *Clasdosporium herbarum* > *Alternaria tenuissima* > *Penicillium expansum* > *Botrytis cinerea* . Pour les parasites latents, le ***Pezicula*** *alba* est beaucoup plus actif que le *P. malicorticis*.

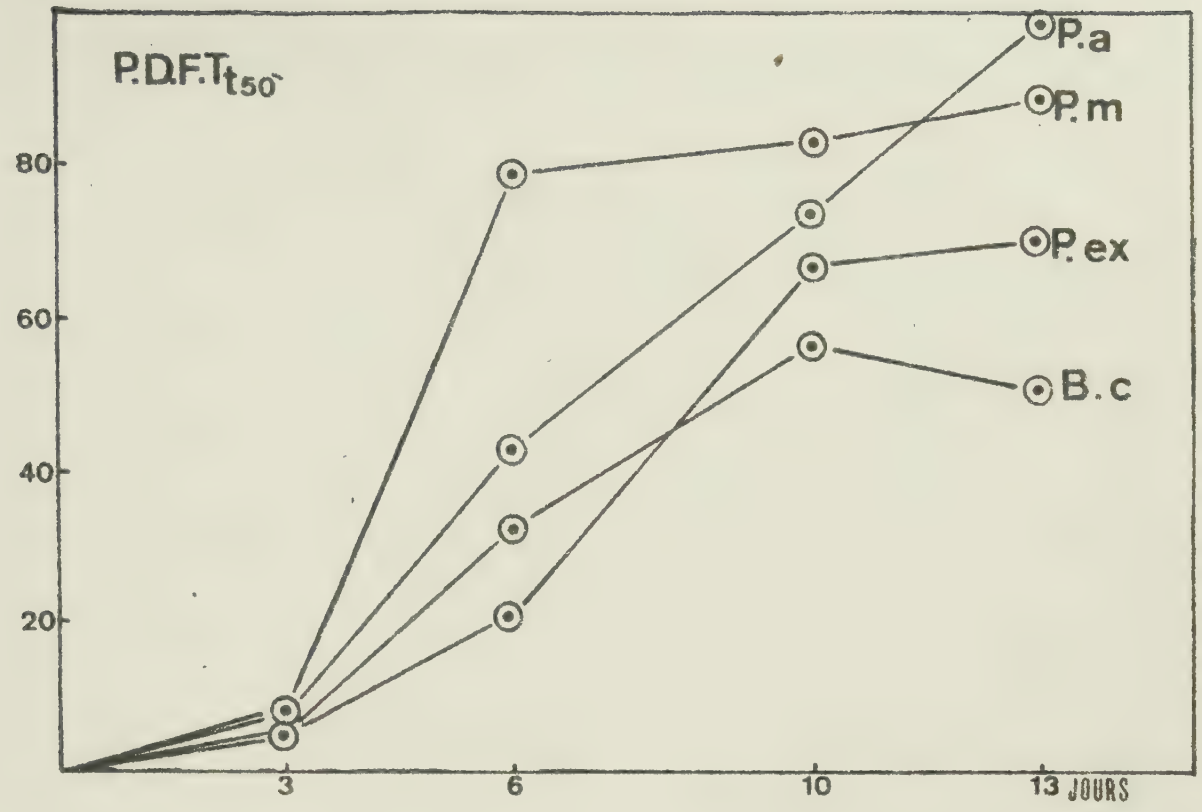


Figure (1) - Sécrétion in vitro d'endo-cellulase par les 4 champignons en fonction du temps à pH 4.0

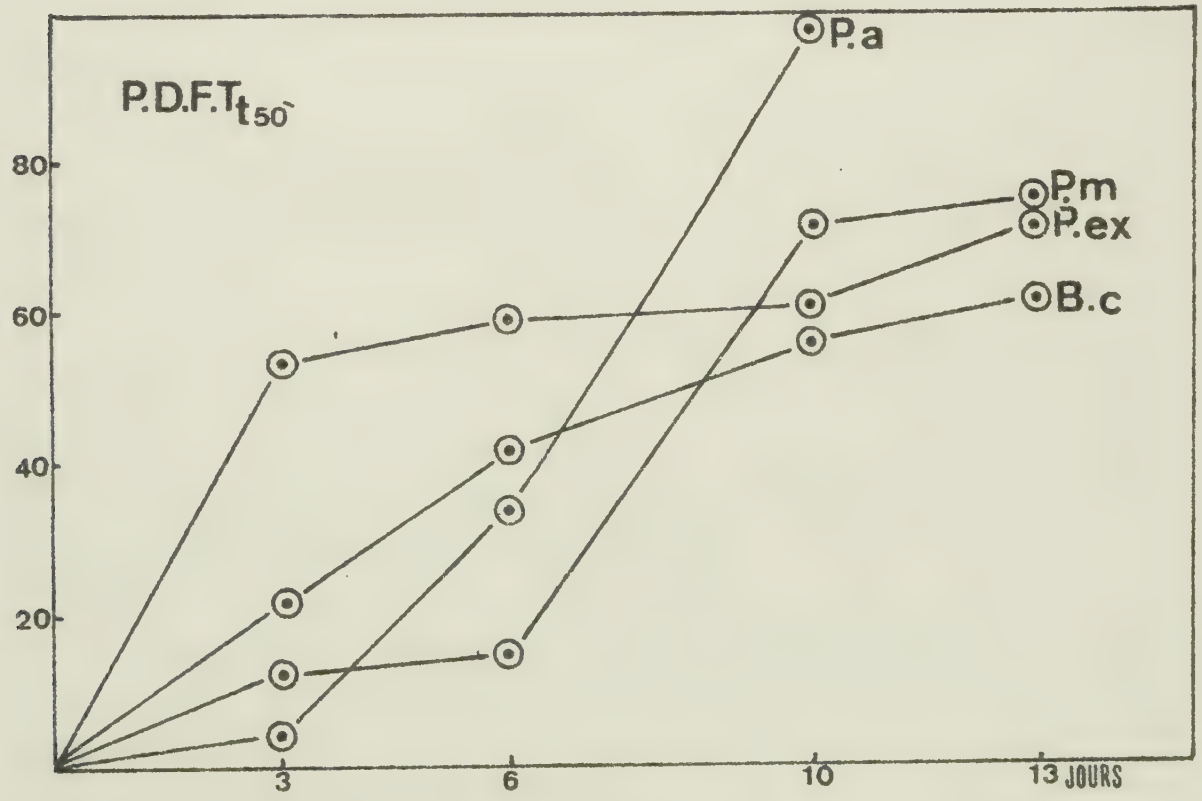


Figure (2) - Sécrétion in vitro d'endo-cellulase par les 4 champignons en fonction du temps à pH 5.3

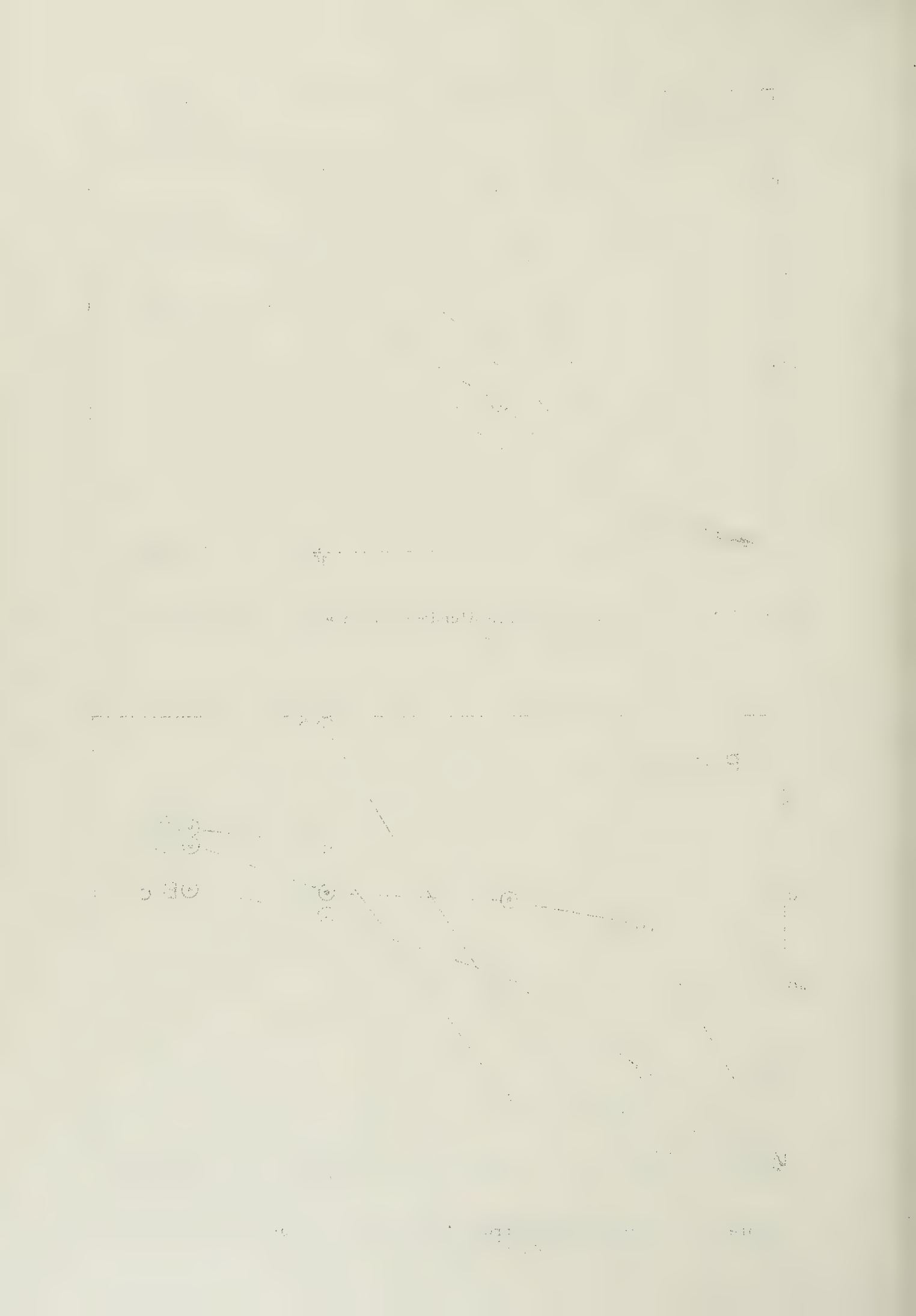


Tableau (5) : Evolution au cours du temps de la quantité de glucides réducteurs

Parasite	pH	U.E./ml de filtrat				
		3 jours	5 jours	7 jours	10 jours	13 jours
A. tenuissima	4.0	40	100	920	1 020	900
	5.3	422	831	938	656	797
B. cinerea	4.0	52	328	860	1 240	1 220
	5.3	117	594	734	2 328	797
C. herbarum	4.0	48	220	440	1 200	1 100
	5.3	78	731	2 218	921	890
P. expansum	4.0	40	200	700	800	660
	5.3	406	703	650	766	671
P. alba	4.0	200	800	912	1 100	980
	5.3	0	87	594	15	765
P. malicorticis	4.0	64	820	928	1 220	920
	5.3	50	422	484	671	703

B - Conclusion

Nous avons souligné la présence de ces enzymes dès le début de la culture, ce qui indique leur synthèse, leur excrétion rapide dans le milieu de culture.

Nous avons remarqué, en ce qui concerne la sécrétion des endo-C_x, qu'en début de culture et pour un pH égal à 5.3, les parasites de blessures sécrètent ces enzymes plus rapidement que les parasites latents ; mais en fin de culture, les parasites latents sont plus actifs bien qu'ils soient moins pathogènes si l'on considère le facteur temps.

La sécrétion très rapide des endo-C_x par les parasites de blessures est accompagnée d'une baisse de l'activité en fin de culture. Deux facteurs peuvent être en cause : 1/ une autolyse des enzymes extracellulaires dans le milieu de culture. 2/ une répression de l'activité enzymatique par les sucres simples libérés dans le milieu à la suite de l'action enzymatique. On peut remarquer en effet, par l'examen des tableaux concernant l'évolution quantitative des groupements réducteurs une augmentation générale de ces derniers. La

réprossion des activités enzymatiques par les sucres a été mise en évidence par KEEN et HORTON (1966).

Les conditions de culture, et, plus spécialement le pH du milieu, sont des facteurs importants qui affectent la production enzymatique, nous avons remarqué que la cinétique de la sécrétion enzymatique est différente chez les parasites de blessures selon le pH. Au contraire, elle est presque comparable dans le cas des parasites latents. Faut-il croire à une sécrétion constante dans le cas de ces derniers ?

La synthèse des cellulases est liée à la présence d'un substrat cellulosique, aucune activité n'a pu être décelée dans les filtrats obtenus en culture sur un substrat pectique ou xylosique.

L'activité cellulolytique est différente suivant que l'on utilise la cellulose insoluble ou la CMC.

4.2. ENZYMES PECTINOLYTIQUES

Les conditions de culture sont les mêmes que dans le cas des cellulases, mais ici, c'est la pectine hautement méthylée qui est utilisée comme seule source de carbone. Deux séries ont été effectuées avec deux pH différents, ajustés en début de culture : 3,2 et 4,0.

42.1. Pectine méthylestérase (PME)

A - Résultats

Tableau (6): Activité pectineméthylestérase in vitro des parasites latents et des parasites de blessures. Unités enzymatiques dans le filtrat rapportées au poids de mycélium (P.S)

Parasites	pH	U.E/ml P.S.
A. tenuissima	3.2 4.0	0.66 1.06
B. cinerea	3.2 4.0	6.17 7.47
C. herbarum	3.2 4.0	0.66 1.58
P. expansum	3.2 4.0	1.35 2.93
P. alba	3.2 4.0	2.87 2.63
P. malicorticis	3.2 4.0	0.10 0.17

Nous constatons que les 6 champignons sécrétent tous la PME en milieu synthétique et en présence de la pectine hautement méthylée comme seule source de carbone. A l'exception d'une activité très élevée dans le cas du *B. cinerea*, les champignons étudiés sont comparables en ce qui concerne la sécrétion de cette enzyme ; le *P. malicorticis* est toutefois moins actif que le *P. alba*. On peut classer en fonction de cette action enzymatique dans un ordre d'activité décroissante : *B. cinerea* ≥ *P. expansum* > *C. herbarum* = *A. tenuissima*.

B - Conclusion

La synthèse de la PME a pu être détectée dans le filtrat de culture des 6 champignons. Dans les conditions de nos expériences le *P. alba* est plus actif que le *P. malicorticis*. Ce résultat va dans le même sens que celui de EDNEY (loc.cit.) . Bien qu'il utilise la même technique de mesure enzymatique, SCHULZ (loc.cit.) considère que le *P. malicorticis* n'est pas capable de sécréter cette enzyme in vitro. L'absence d'activité est peut être due au pH non favorable du milieu de culture (le pH du milieu est ajusté à pH 5.0) étant donnéela variation de la sécrétion enzymatique que nous avons obtenue aux différents pH utilisés.

Nous avons remarqué que le *B. cinerea* est environ 6 fois plus actif que les autres. Cette activité PME élevée est accompagnée d'une activité PMG faible, spécialement à pH 3.2.Il est possible que cette enzyme joue un rôle dans le pouvoir pathogène de ce champignon. Cependant on sait par ailleurs (HANCOCK et al. , 1964) que ce champignon, à l'inverse des autres *Botrytis* (*B. allii* et *B. squamosa* WALK.), produit en abondance une polygalacturonase. Dès lors, le mécanisme d'attaque par le *B. cinerea* s'explique mieux. Altérant tout d'abord la pectine par sa PME, il provoque la formation d'acides pectinique et pectique qui seront hydrolysés par la PG. Sa faible production en PMG ne gêne ainsi en aucune manière la pénétration rapide et extensive des tissus de fruits.

42.2. Endo-polyméthylgalacturonase

A - Résultats

Tableau (7) : Sécrétion d'endo-polyméthylgalacturonase (endo PMG) en fonction du temps.

Parasite	pH	PUFT/ml de filtrat			
		3 jours	6 jours	10 jours	13 Jours
A. tenuissima	3.2. 4.0	5 48	24 50	32 17	26 51
B. cinerea	3.2 4.0	6 2	11 3	12 58	13 85
C. herbarum	3.2 4.0	4 14.5	32 27	34 28.5	19 20
P. expansum	3.2 4.0	11 30	13 66	22 100	100 100
P. alba	3.2 4.0	0 3	1 13	4 28	5 44
P. malicorticis	3.2 4.0	3 8	15 24	18 24	20 26

L'examen du tableau (7) fait ressortir que les champignons étudiés sécrétent l'Endo PMG. Nos résultats confirment ceux de COLE et WOOD (1961), EDNEY (1964), BOMPEIX (1972) et SCHULZ (1972).

A l'opposé de ce que nous avons rencontré dans le cas des Endo-cellulases, les parasites de blessures sont plus actifs que les parasites latents dans la sécrétion d'Endo PMG.

D'une façon générale nous constatons que les deux groupes sont plus actifs dans leur sécrétion enzymatique à pH 4.0 (cf. figures 3 et 4). De plus il semble que le facteur pH influence la cinétique de cette sécrétion : l'activité à pH 3.2 s'exerce au début de la culture à un bas niveau, puis progresse ensuite très lentement. A pH 4.0, en revanche, l'activité est très élevée du début jusqu'au 10ème jour ; après quoi elle baisse pour certains parasites (*A. tenuissima, C. herbarum*) et elle progresse pour d'autres (*P. alba,*

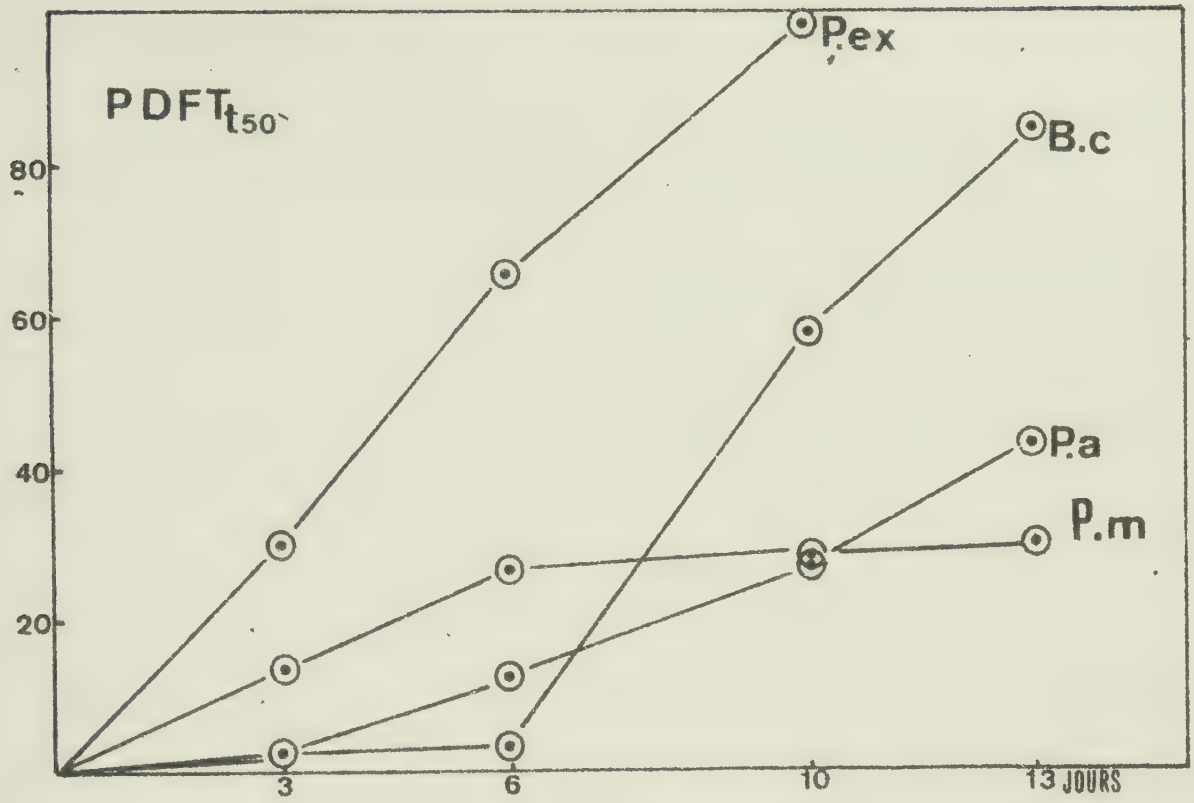


Figure (3) - Activités endo-polyméthylgalacturonases in vitro au cours du temps à pH 4,0

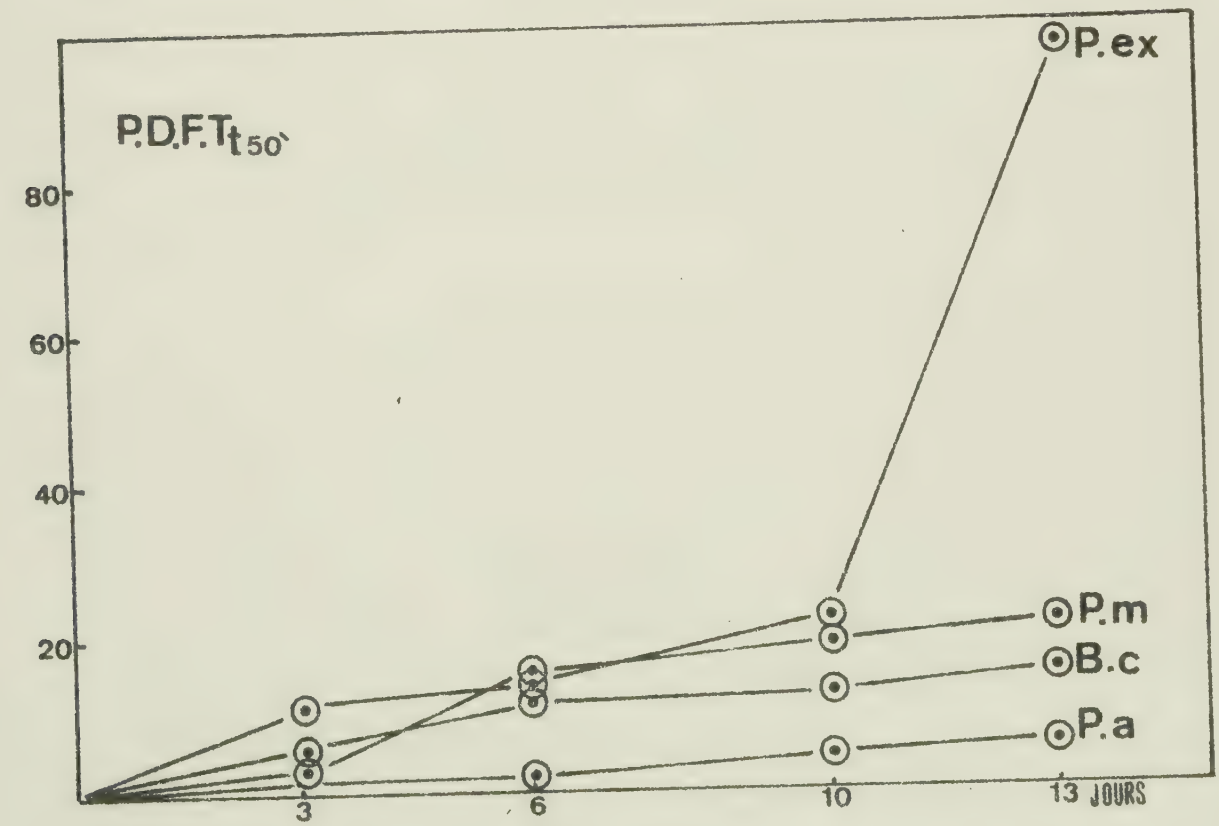


Figure (4) - Activités endo-polyméthylgalacturonases in vitro au cours du temps à pH 3.2

P. malicorticis, B. cinerea). Cependant il semble que le *P. malicorticis* échappe à ce phénomène (la cinétique étant la même aux deux pH).

Nous pouvons, d'après le tableau (7), classer les champignons étudiés selon leurs activités endo-PMG en ordre décroissant :

Parasites de blessures	pH 3.2	*P. expansum* > *A. tenuissima* > *C. herbarum* > *B. cinerea*
	pH 4.0	*P. expansum* > *B. cinerea* > *A. tenuissima* > *C. herbarum*
Parasites latents	pH 3.2	*P. malicorticis* > *P. alba*
	pH 4.0	*P. alba* > *P. malicorticis*

B - Conclusion

Nous avons pu montrer, en ce qui concerne cette enzyme, que les parasites expérimentés la sécrète dès le début de culture. Les parasites de blessures (plus actifs dans le temps) sécrétent l'endo-PMG très rapidement, et leur activité en fin de culture est supérieure à celle des parasites latents. (sauf le *B. cinerea)*. Ces derniers ont une faible production d'enzymes au début de la culture.

Il nous a semblé (comme dans le cas des endo et exo-cellulases) que le facteur pH joue un rôle sur la sécrétion plus ou moins rapide des enzymes, mais seulement en partie en influençant la croissance mycélienne. A cet égard, nous avons remarqué que la croissance mycélienne des parasites de blessures (sauf le *B. cinerea*) est plus grande à pH 3.2, bien que l'activité enzymatique pour ce groupe soit, au contraire plus grande à pH 4.0. En revanche, pour les parasites latents, l'augmentation de l'activité enzymatique à pH 4.0 par rapport au pH 3.2 est accompagnée d'une augmentation du poids sec du mycélium pour les deux champignons.

4.3. ENZYMES HEMICELLULOLYTIQUES (xylanase)

Nous avons essayé de mettre le xylane en solution visqueuse pour pouvoir mesurer l'activité endo-xylanase par viscosimétrie. En effet le xylane à 10 % dans la soude (NaOH 4,0 %), forme une solution visqueuse, mais cette solution se recristallise si l'on veut revenir en milieu acide. Comme l'activité enzymatique des parasites fongiques, en général, se situe en milieu acide (WOOD, 1967), nous n'avons pas pu, de ce fait, réaliser cette expérience.

Nous avons étudié la sécrétion d'exo-xylanase in vitro par les 6 champignons car la littérature ne fait état d'aucune investigation dans ce sens.

A - Résultats

Tableau (8) : Activité exo-xylanase

Parasite	pH	U.E/ml	U.E/mg P.S
A. tenuissima	4.0 5.0	202 402	74 52
B. cinerea	4.0 5.0	492 392	82 34
C. herbarum	4.0 5.0	439 388	93 36
P. expansum	4.0 5.0	470 434	128 48
P. alba	4.0 5.0	382 4	58 5
P. malicorticis	4.0 5.0	348 112	60 19

Le tableau (8) montre bien que les 6 champignons étudiés sécrétent de l'exo-xylanase (en culture agitée dans le milieu de RICHARDS avec le xylane comme seule source de carbone).

Nous constatons que les parasites latents sont moins actifs dans la sécrétion de cette enzyme que les parasites de blessures. En outre ces derniers sécrétent la xylanase plus rapidement que les parasites latents.

Comme nous l'avons constaté pour les cellulases, le pH élevé favorise uniquement, chez les parasites de blessures, une plus rapide sécrétion de cette enzyme que chez les parasites latents.

Parmi les parasites de blessures on constate que c'est le *P. expansum* qui est le plus actif, suivi par *C. herbarum*, *B. cinerea*, *A. tenuissima*.

En ce qui concerne les parasites latents, le *P. malicorticis* s'est révélé légèrement plus actif que le *P. alba*, particulièrement à pH 5.0.

Tableau (9) : Evolution dans le temps de la quantité de glucides réducteurs

Parasite	pH	U.E/ml de filtrat				
		3 jours	5 jours	7 jours	10 jours	13 jours
A. tenuissima	4.0	486	459	148	27	94
	5.0	243	365	365	122	1270
B. cinerea	4.0	189	986	1675	41	41
	5.0	311	811	1257	284	284
C. herbarum	4.0	175	716	622	68	68
	5.0	514	541	1105	284	378
P. expansum	4.0	153	1189	1648	82	54
	5.0	495	3865	527	276	378
P. alba	4.0	176	257	838	716	676
	5.0	60	81	162	175	216
P. malicorticis	4.0	419	1135	729	122	41
	5.0	437	554	1162	419	243

B - Conclusion

Nous avons montré la capacité des champignons étudiés à sécréter la xylanase in vitro. La sécrétion de cette enzyme nous a paru un phénomène de nature adaptative ; nous n'avons pas décelé cette activité dans les filtrats de culture ayant comme seule source de carbone la CMC ou la pectine.

Nous avons constaté que les parasites de blessures (plus pathogènes dans le temps) sont plus actifs dans la sécrétion de cette enzyme que les parasites latents, même dans le cas de ces derniers ; le parasite le plus pathogène, le *P. malicorticis*, est plus actif que le *P. alba*. Ce fait nous laisse supposer que cette enzyme pourrait intervenir dans la pathogénèse.

Nous avons montré que le maximum de sécrétion enzymatique avait lieu lorsque les champignons étaient cultivés à pH 4.0, nous avons noté d'autre part, qu'à l'exception du *P. alba*, les autres parasites expérimentés croissent mieux à pH 5.0 . On peut conclure que la sécrétion de cette enzyme est un phénomène relativement indépendant de la croissance mycélienne ; autrement dit, les conditions de culture qui favorisent la croissance pondérale d'un champignon, ne sont pas forcément les mêmes que celles qui favorisent l'activité enzymatique. BARKER et WALKER (1962) examinant le pouvoir pathogène de différentes souches de *Pellicularia filamentosa* (PAT.) ROGERS, ont montré qu'il y a une corrélation nette (Γ = 0,63) entre l'activité PG et le pouvoir pathogène. Au contraire, un coefficient de (Γ = 0,25) a été obtenu entre le pouvoir pathogène et la croissance pondérale en milieu de culture.

4.4. ENZYMES PROTEOLYTIQUES

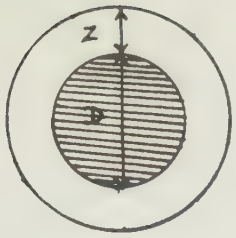
Des boîtes de Pétri contenant le milieu 2 sont ensemencées par piqûre centrale avec un fragment calibré (5 mm de diamètre) du mycélium frontal. Les essais sont renouvelés trois fois. Des mesures du diamètre de la colonie et l'étendue de la zone de lyse ont été effectuées à des intervalles réguliers.

A - Résultats

Les résultats figurant dans le tableau ci-dessous, représentent la moyenne des 3 mesures.

Tableau (10) : Moyennes des diamètres de la colonie et l'épaisseur de la zone de lyse.

Parasite	3 jours		6 jours		9 jours		13 jours	
	D	Z	D	Z	D	Z	D	Z
A. tenuissima	14	2	30	4	41	8	44	19
B. cinerea	20	0	47	0	66	1	76	2
C. herbarum	6	3	11	8	19	10	21	12
P. expansum	13	0	22	0	32	0	37	0
P. alba	5	1,5	12	2,5	20	4	25	7,5
T. malicorticis	9	1,0	16	2	23	2,5	28	3,5



D = diamètre de la colonie en mm.

Z = épaisseur de la zone de lyse en mm.

Les résultats semi-quantitatifs figurés dans le tableau nous permettent de constater que :

. Le *P. expansum* ne sécrète pas cette enzyme,

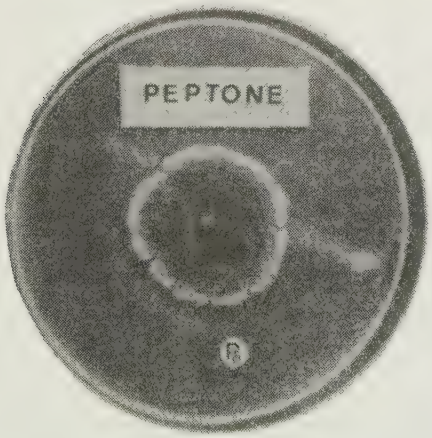
. Le *B. cinerea* est très faible dans la sécrétion de cette enzyme, en effet, nous n'avons remarqué la zone d'hydrolyse qu'à partir du 9è jour.

. Pour les quatre autres champignons, l'augmentation de diamètre de la colonie (en fonction du temps, est accompagnée par une augmentation régulière de la zone de lyse.

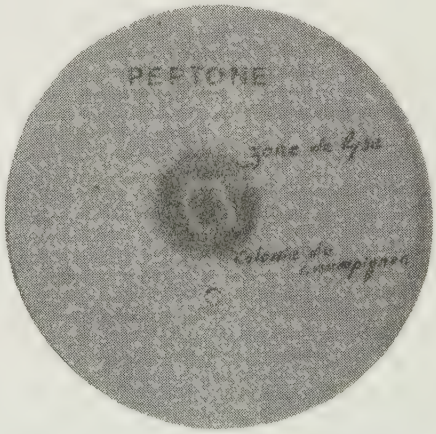
. Pour les parasites de blessures, l' *A. tenuissima* croît plus rapidement sur le milieu utilisé, et la zone d'hydrolyse qu'il provoque est plus importante que celle due au *C. herbarum*.

. Les deux *Pezicula* sont capables de sécréter cette enzyme. On peut remarquer facilement que le *P.alba* est plus actif que le *P. malicorticis*, en outre, on constate aussi que la réaction est plus nette dans le cas du *P. alba* , bien que sa croissance soit légèrement inférieure à celle du *P. malicorticis*.

Nous avons voulu détecter cette activité à pH 4.0 qui correspond au pH de jus de pomme, mais nous nous sommes heurtés à une difficulté technique, étant donné que la protéine se précipite à ce pH.



absence de l'activité protéolytique dans le cas du *P. expansum*.



présence de l'activité protéolytique dans le cas du *C. herbarum*.

B - Conclusion

Bien que cette méthode nous donne une idée sur la sécrétion des enzymes protéolytiques, elle manque de précision. En effet, on ne peut pas faire un rapport entre la zone d'hydrolyse et le poids sec du mycélium (difficile à extraire), ce dernier ayant un aspect plus ou moins épais selon le parasite en question. Par exemple, le *B. cinerea* forme une colonie très mince à la surface du milieu, contrairement au *P. alba*.

4.5. CROISSANCE PONDERALE EN FONCTION DES SUBSTRATS UTILISES

A - Résultats

Tableau (11) : Poids sec du mycélium en milligrammes sur différents substrats pour les 6 champignons expérimentés.

Substrats / Parasites	C.M.C.		Pectine		Xylane	
	pH 4.0	pH 5.3	pH 3.2	pH 4.0	pH 4.0	pH 5.0
A. tenuissima	58	137	647	314	275	1270
B. cinerea	216	127	50	527	605	1140
C. herbarum	79	49	598	394	470	1070
P. malicorticis	95	67	67	970	580	710
P. expansum	157	68	811	450	367	900
P. alba	104	76	106	1360	660	76

Avec la pectine les rendements mycéliens, en poids sec, sont supérieurs à ceux obtenus sur le milieu renfermant le CMC , et à peu près comparables à ceux obtenus sur le milieu renfermant le xylane.

Le pH des solutions nutritives du départ (en fonction du temps on constate une alcalinisation progressive) influence la croissance mycélienne.

Sur le milieu contenant du xylane, excepté le *P. alba* , les 5 champignons croissent mieux à pH 5.0.

Avec la C.M.C., à l'exception de l'*A. tenuissima*, les 5 champignons croissent mieux à pH 4,0.

Avec la pectine, bien qu'il y ait des variations, les *B. cinerea*, *P. malicorticis*, *P. alba* ont une croissance bien plus grande à pH 4.0. En revanche les *A. tenuissima*, *C. herbarum*, et *P. expansum* croissent mieux à pH 3.2.

Enfin, l'aspect macroscopique des cultures se présente sous forme d'amas globuleux dans les récipients soumis à agitation, alors que le mycélium recouvre d'un voile compact les milieux solides.

B - Conclusion

L'ensemble de nos résultats montre que les champignons étudiés sont capables d'emprunter à la pectine, à la C.M.C., et au xylane le carbone nécessaire à la synthèse de leurs tissus .

Le développement des champignons sur le CMC (en général) est très différent de celui constaté sur la pectine et le xylane. La faible densité du mycélium souligne le caractère peu nutritif de ce substrat. Ce résultat est en accord avec les résultats de TOUZE (1964) et de MARAITE (1969).

4.6. INFLUENCE DES ACIDES AMINES SUR LA PRODUCTION D'ENZYMES PECTINOLYTIQUES . IN VITRO

L'influence des acides aminés sur le développement des champignons a été étudiée en partant d'une hypothèse précise : Est-ce que les champignons sont capables de s'accroître en utilisant certains acides aminés comme seule source d'azote. Une bonne croissance des champignons saprophytes et des parasites non obligatoires, a été obtenue en présence des substrats azotés tels que l'hydrolysat de caséine ou la peptone, qui consistent en un mélange d'acides aminés. Mais beaucoup d'entre eux sont capables de s'accroître sur un milieu contenant l'asparagine (COCHRANE, 1958, KIRPAL et al., 1970) de l'acide glutamique (STEINBERG, 1950) ou de l'acide aspartique (STRIDER, 1959). D'autres acides aminés se sont révélés être des inhibiteurs de la croissance mycélienne tels que la dihydroxyphénylalanine qui inhibe le *Venturia inaequalis* (CKE) WINT. (KUC et al., 1962) ,la cystéine, la cystine, la leucine et la méthionine qui inhibent le *Clasdosporium cucumerinum* ELL. et ARTH. (STRIDER, 1959).

L'effet stimulant ou inhibiteur des acides aminés dépend surtout des concentrations utilisées et de la composition du milieu du culture, en particulier, la présence d'autres acides aminés, ou de microéléments (VAN ANDEL, 1966).

Le pouvoir pathogène ou la virulence peuvent être influencés par la présence de certains acides aminés dans le milieu de culture.
L' *Helminthosporium sativum* PAM. KING. et BAKKE montre une perte du pouvoir pathogène à l'égard du blé après croissance sur un milieu contenant de l'alanine, de l'arginine, de l'histidine, du méthionine, de la sérine, de la thréonine, ou du tryptophane (HRUSHOVETZ, 1957). L'acide aspartique provoque une perte du pouvoir pathogène chez le *Colletotrichum phomoides* SACC. CHESTER à l'égard de la tomate.

Nous avons essayé l'influence de 4 acides aminés (B. alanine, cystéine, ac. glutamique, et hydroxy-proline) car ces amino-acides se révèlent stimulants de la pathogénèse (BOMPEIX, 1973) comparé avec la source azotée du milieu de RICHARDS (KNO^3), sur la croissance, et la production des enzymes pectinolytiques (les plus liées au pouvoir pathogène) par les champignons expérimentés.

A - Résultats

Un essai préliminaire nous a permis de constater qu'une concentration de 200 mg N/l et pH 4.0 donnent les meilleurs résultats.

Le milieu de culture utilisé est la solution minérale de RICHARDS + pectine hautement méthylée à 1 % + 200 mg N/l ajusté à pH 4.0. Ce milieu est réparti à raison de 35 ml dans des erlenmeyers de 150 ml. Après stérilisation les erlenmeyers sont ensemencés avec un fragment calibré de mycélium frontal et soumis à une agitation (100 secousse/mn).

Après un délai de 8 jours, les cultures sont filtrées sur préfiltres millipores afin de récupérer d'une part, le mycélium pour déterminer son poids sec, et d'autre part, le filtrat de culture en vue de mesurer les différentes activités enzymatiques.

Les résultats sont figurés dans les tableaux (12 à 17) et les activités endo-polyméthylgalacturonase et endo-polygalacturonase, pour chaque champignon, sont représentées sur des graphiques en fonction de différents acides aminés employés (cf. figures de 5 à 16).

Bien que la source de carbone utilisée dans le milieu de culture soit toujours la pectine hautement méthylée, les activités endo-PG sont plus intenses que les activités endo-PMG.

L'acide glutamique, comme source azotée, s'est révélé le plus stimulant pour la croissance mycélienne ainsi que pour les activités enzymatiques produites.

Nous constatons qu'il y a une tendance à l'alcalinisation du filtrat en fin de culture quand l'azote est employé sous la forme d'acide glutamique et de KNO_3.

Tableau (12) : Influence de la source azotée sur la croissance et les activités pectinolytiques de *Pezicula alba*.

	pH du filtrat à la fin de la culture	Poids sec (mg)	exo-PG UE/ml mélange réactionnel	PME UE/mg P.S.
Ac. glutamique	6,50	166	1010	3,01
β-alanine	4,15	4	30	-
Cystéine	3,50	4	145	3,02
H. proline	3,90	5	640	-
KNO_3	3,25	15	420	0,84

Tableau (13) : Influence de la source azotée sur la croissance et les activités pectinolytiques de *Pezicula malicorticis*.

	pH du filtrat à la fin de la culture	Poids sec en (mg)	exo-PG UE/ml mélange réactionnel	PME UE/mg P.S.
Ac. glutamique	5,40	94	960	3,06
β-alanine	4,15	7	20	-
Cystéine	3,00	8	690	24,50
H. proline	3,60	15	450	-
KNO_3	3,30	9	510	1,80

Tableau (14) : Influence de la source azotée sur la croissance et les activités pectinolytiques d'*Alternaria tenuissima*

	pH du filtrat à la fin de la culture	Poids sec en (mg)	exo-PG UE/ml mélange réactionnel	PME UE/mg P.S
Ac. glutamique	6,30	117	892	-
β-alanine	4,00	57	475	-
Cystéine	3,40	6	500	5,76
H. proline	4,05	80	510	-
KNO_3	5,60	120	663	0,21

Tableau (15) : Influence de la source azotée sur la croissance et les activités pectinolytiques de *Cladosporium herbarum*.

	pH du filtrat à la fin de la culture	Poids sec en(mg)	exo-PG UE/ml mélange réactionnel	PME UE/mg P.S
Ac. glutamique	6,30	133	820	0,63
β-alanine	4,00	12	195	-
Cystéine	3,50	9	360	-
H. proline	3,60	37	490	-
KNO_3	3,50	50	590	0,30

Tableau (16) : Influence de la source azotée sur la croissance et les activités pectinolytiques de *Botrytis cinerea*.

	pH du filtrat à la fin de la culture	Poids sec en (mg)	exo-PG UE/ml mélange réactionnel	PME UE/mg P.S
Ac. glutamique	5,70	142	895	5,01
β-alanine	3,70	13	395	-
Cystéine	3,00	8	175	10,37
H. proline	3,40	72	370	27,18
KNO_3	6,40	114	823	20,90

Tableau (17) : Influence de la source azotée sur la croissance et les activités pectinolytiques de *Penicillium expansum*.

	pH du filtrat à la fin de la culture	Poids sec en (mg)	exp-PG UE/ml mélange réactionnel	PME UE/mg P.S
Ac. glutamique	5,50	185	842	-
β-alanine	3,90	69	875	-
cystéine	2,90	43	815	-
H. proline	4,15	138	620	-
KNO_3	5,80	104	670	0,28

En revanche, une tendance à l'acidification s'opère avec les autres acides aminés.

(1) en ce qui concerne la sécrétion d'endo-PG et endo-PMG on constate pour les deux *Pezicula* (cf. figures 5 à 8) : les acides aminés ont la même influence sur la sécrétion de ces enzymes chez les deux champignons. La β-alanine s'est révélée l'acide aminé le moins stimulant pour la sécrétion d'endo-PG. Cependant, pour l'endo PMG, tandis que la cystéine ralentit la sécrétion de cette enzyme chez le *P. alba* ; elle a un effet inverse sur le *P. malicorticis*. Pour les 4 autres champignons, la cystéine s'est révélée inhibitrice pour ces deux enzymes (cf. figures 9 à 16)

(2) en ce qui concerne la sécrétion d'exo-PG , nous constatons que cette enzyme est influencée, elle aussi, par la nature de la source d'azote apportée au milieu. Chez les deux *Pezicula* (cf. tableaux 12 et 13), la sécrétion de cette enzyme est ralentie (inhibée) quand l'azote est employé sous la forme de β-alanine; chez les 4 autres champignons (cf. tableaux 14 à 17), on ne peut pas parler d'une véritable inhibition, bien que, avec la cystéine, la production de cette enzyme par le *B. cinerea* soit moins importante.

On constate, en outre, que la faible production d'endo-PG par le *P. expansum* avec la cystéine est accompagnée par une sécrétion intense d'exo-PG.

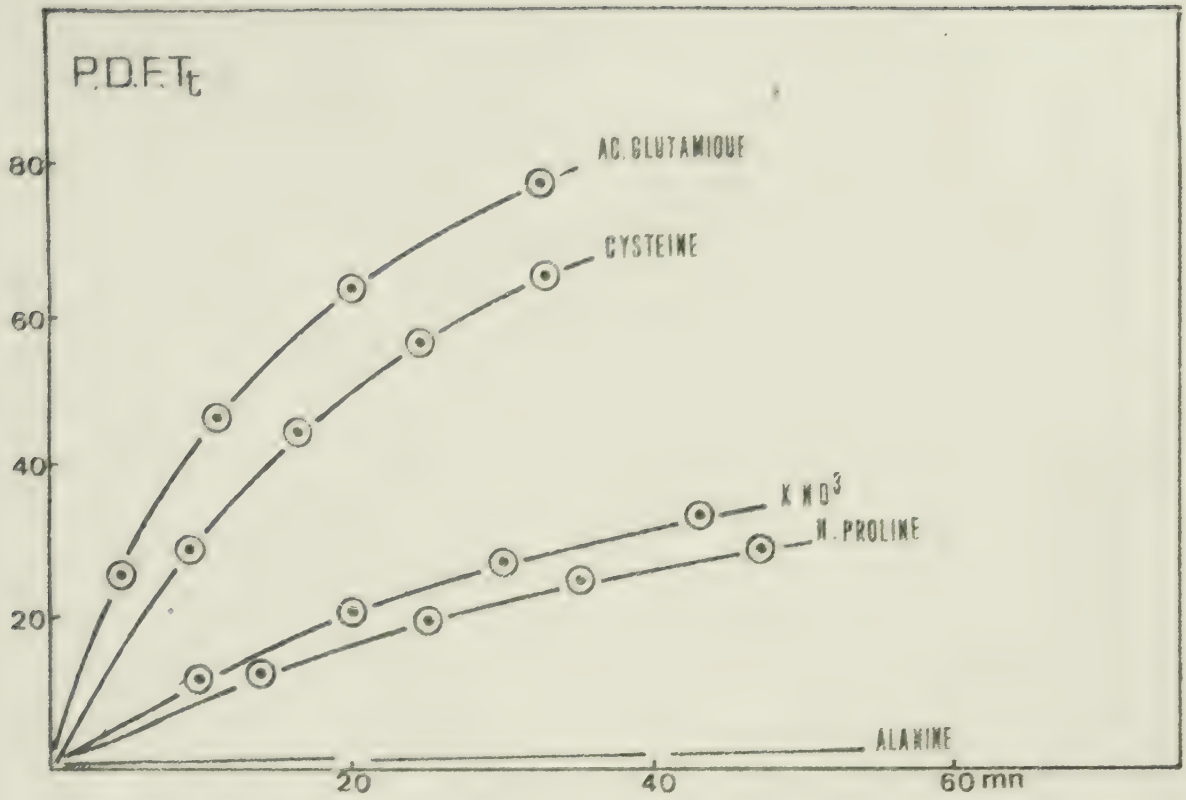


Figure (5) - Influence de la source azotée sur la sécrétion d'endo-polyméthylgalacturonase par le *Pezicula malicorticis*.

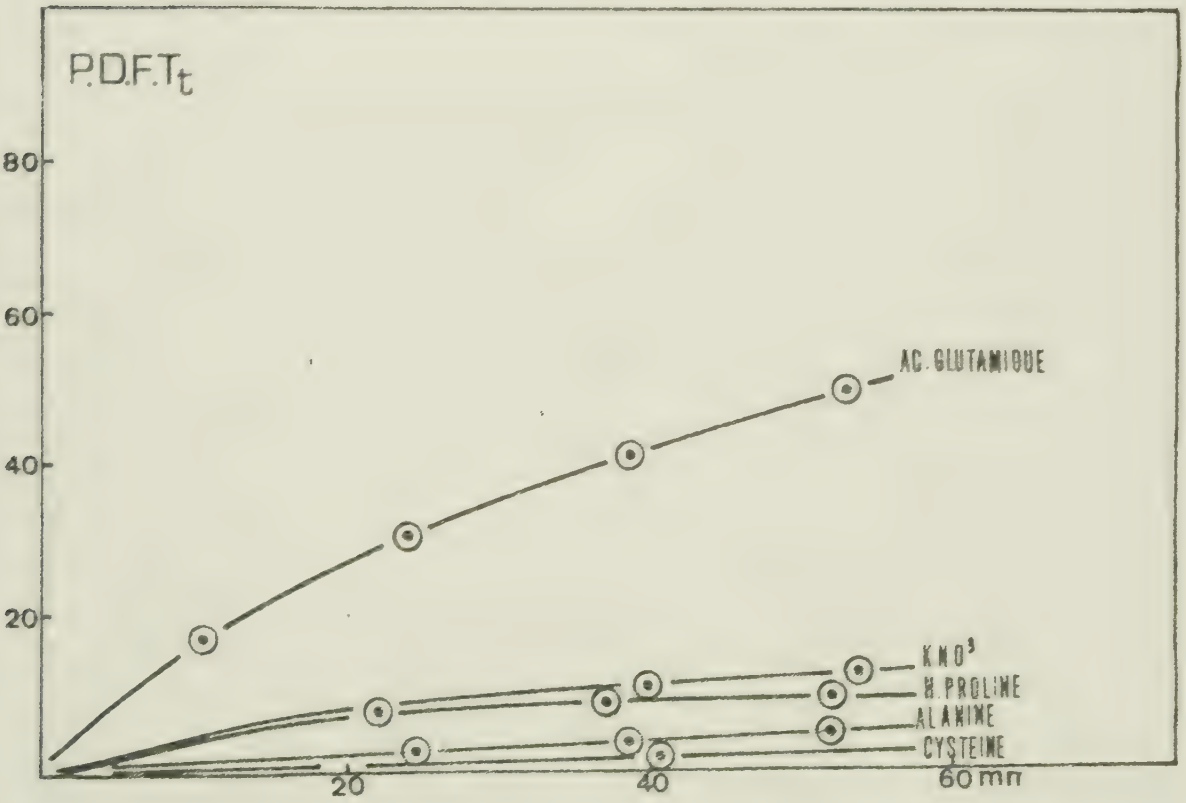


Figure (6) - Influence de la source azotée sur la sécrétion d'endo-polyméthylgalacturonase par le *Pezicula alba*.

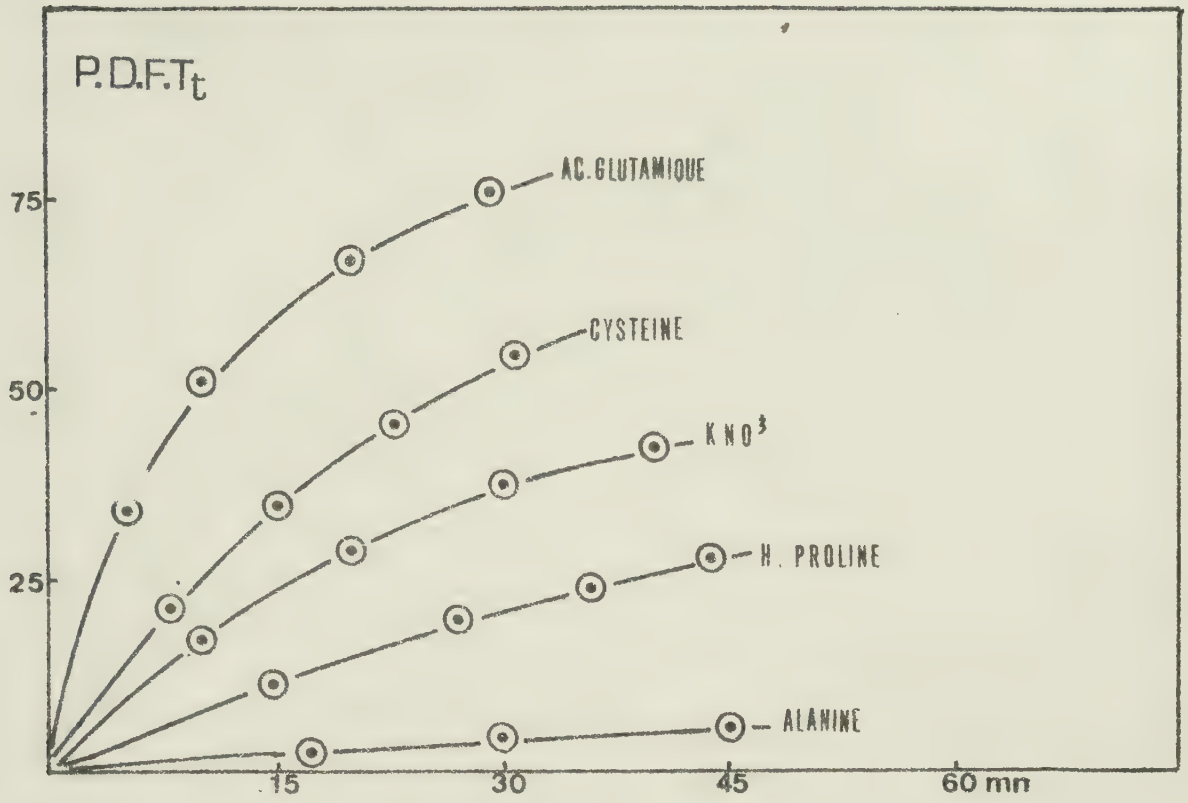


Figure (7) - Influence de la source azotée sur la sécrétion d'endo-polygalacturonase par *Pezicula alba*.

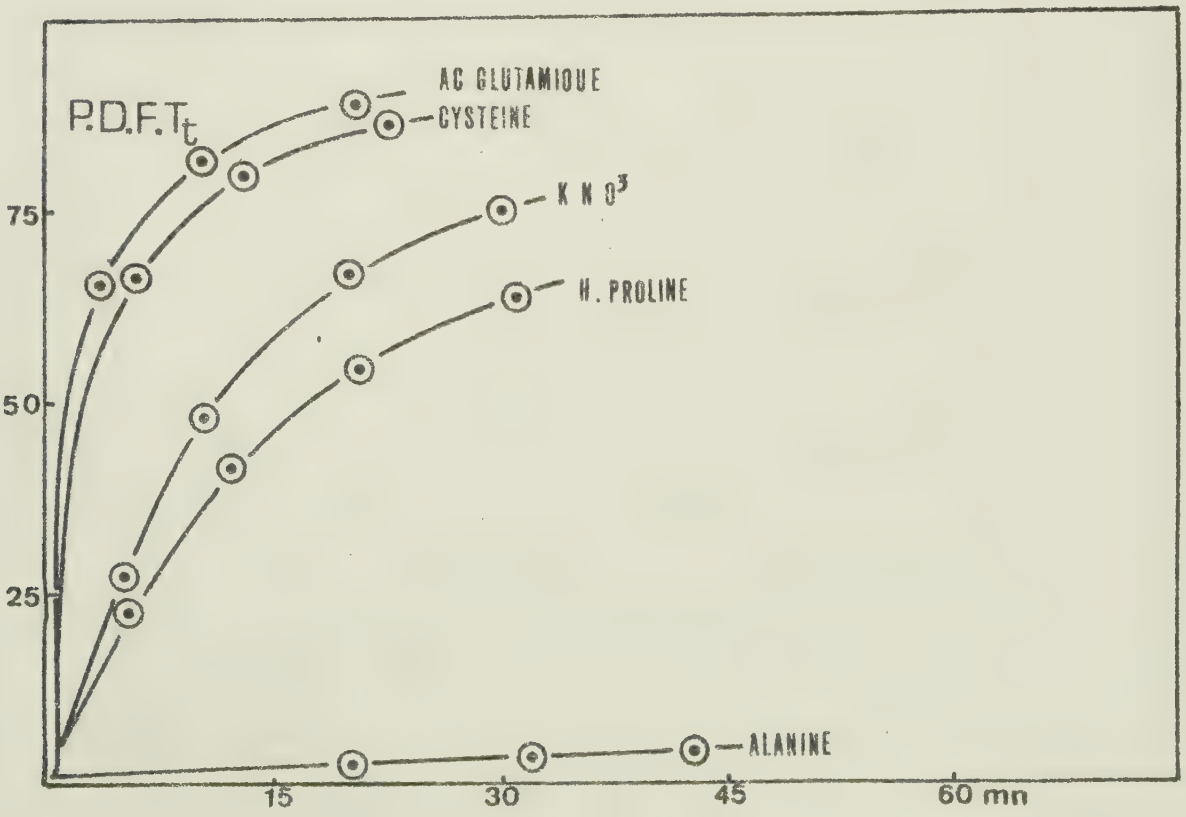


Figure (8) - Influence de la source azotée sur la sécrétion d'endo - polygalacturonase par le *Pezicula malicorticis*.

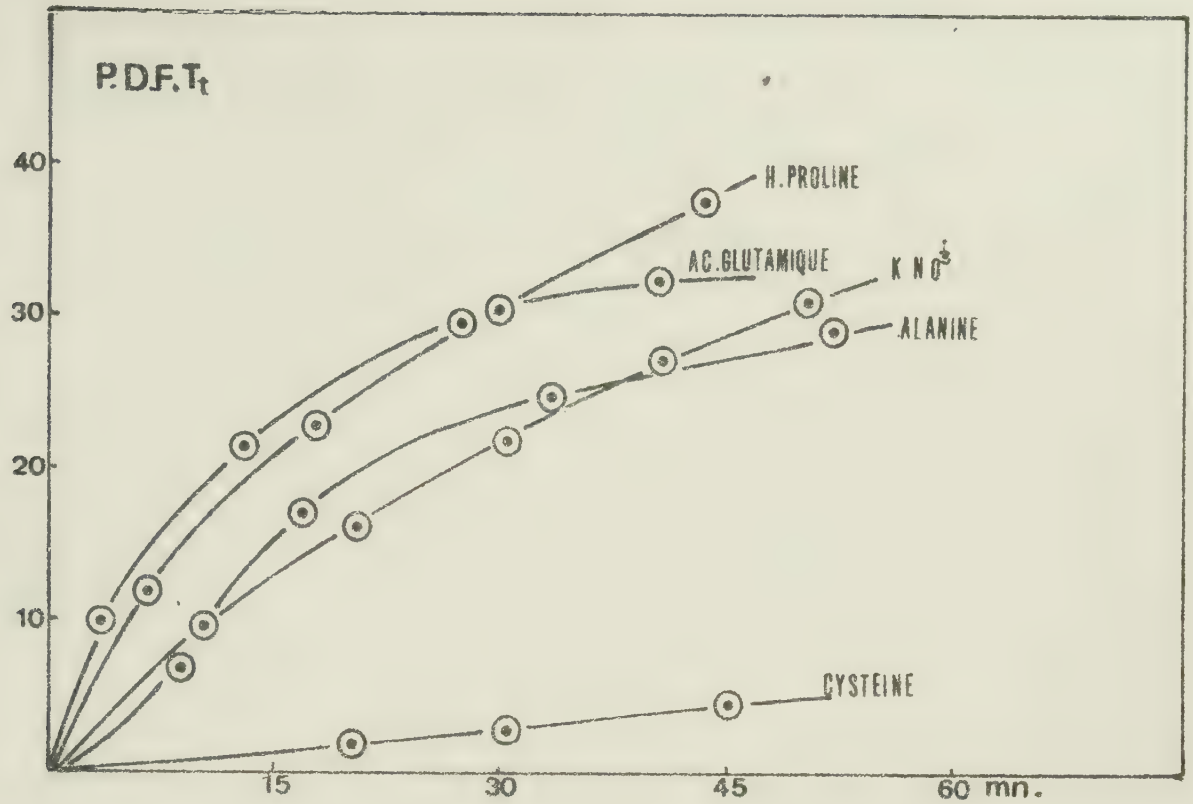


Figure (9) - Influence de la source azotée sur la sécrétion d'endo-polyméthylgalacturonase par *l'Alternaria tenuissima*.

Figure (10) - Influence de la source azotée sur la sécrétion d'endo-polyméthylgalacturonase par le *Cladosporium herbarum*.

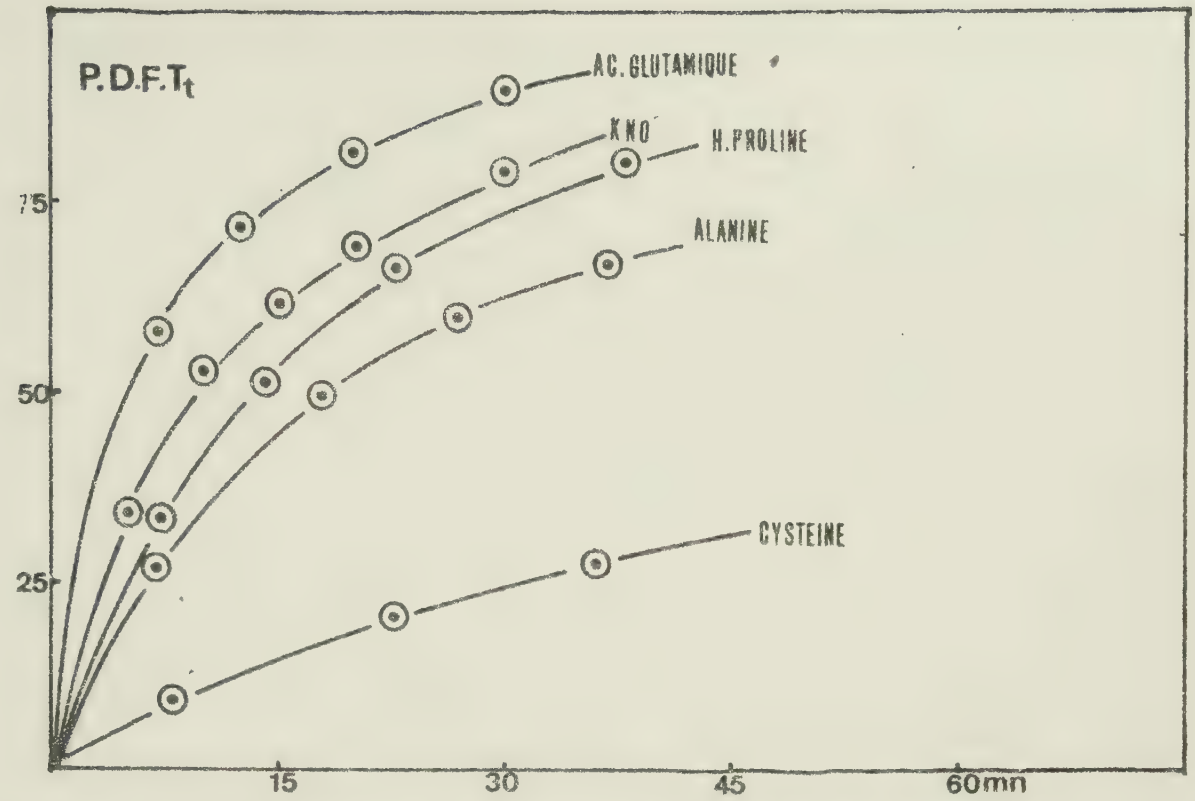


Figure (11) - Influence de la source azotée sur la sécrétion d'endo-polygalacturonase par l'*Alternaria tenuissima*.

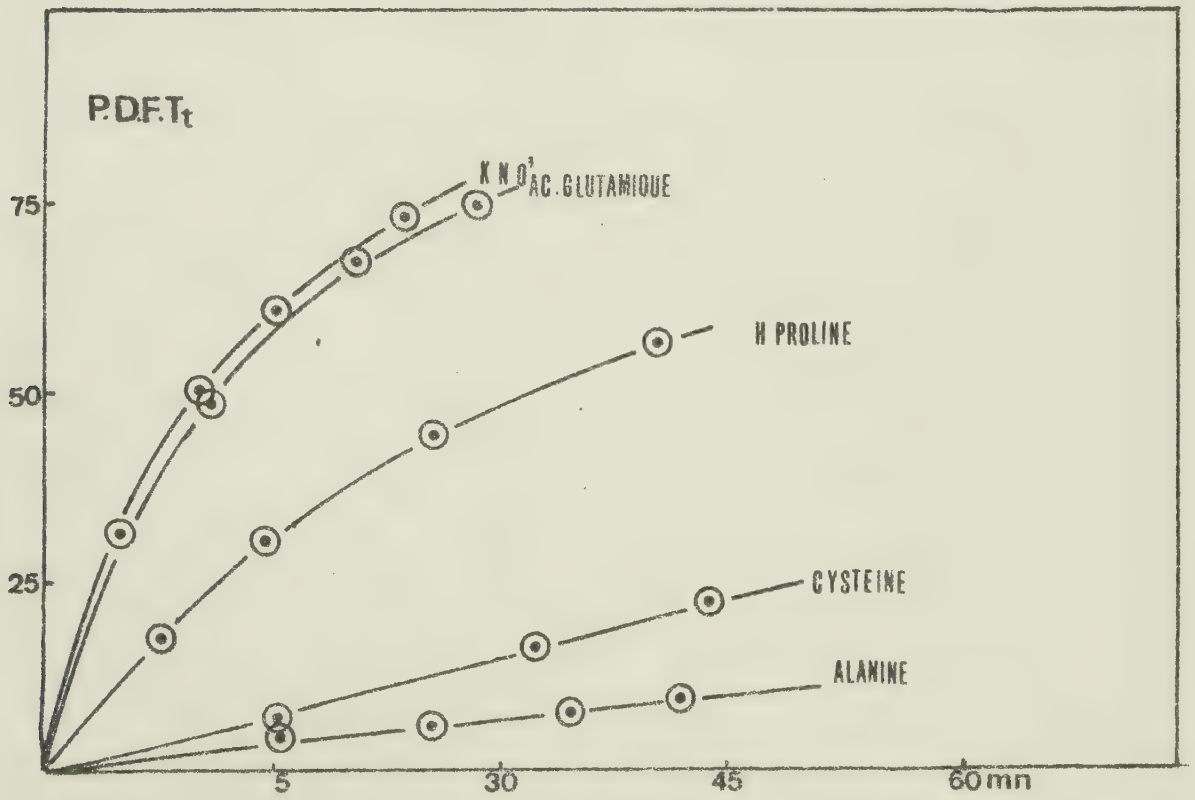


Figure (12) - Influence de la source azotée sur la sécrétion d'endo-polygalacturonase par le *Cladosporium herbarum*

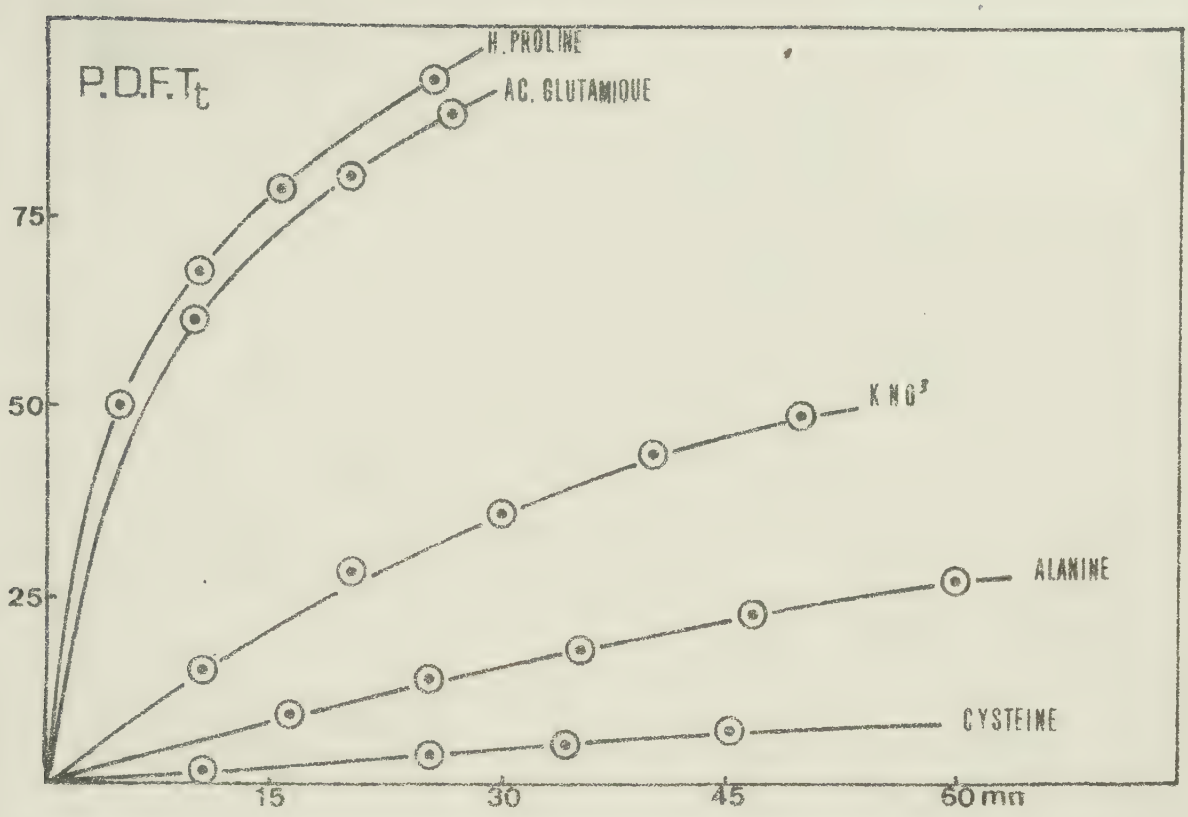


Figure (13) - Influence de la source azotée sur la sécrétion d'endo-polygalacturonase par le *Botrytis cinerea*

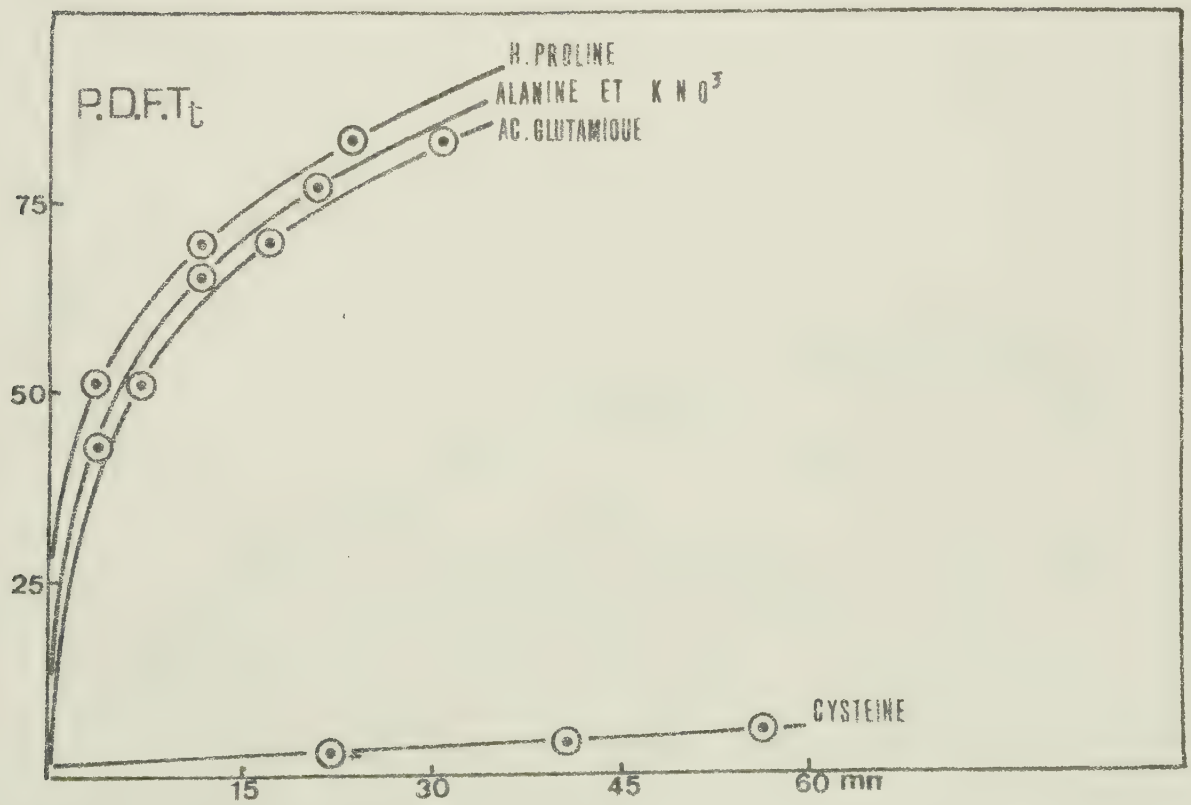


Figure (14) - Influence de la source azotée sur la sécrétion d'endo-polygalacturonase par le *Penicillium expansum*

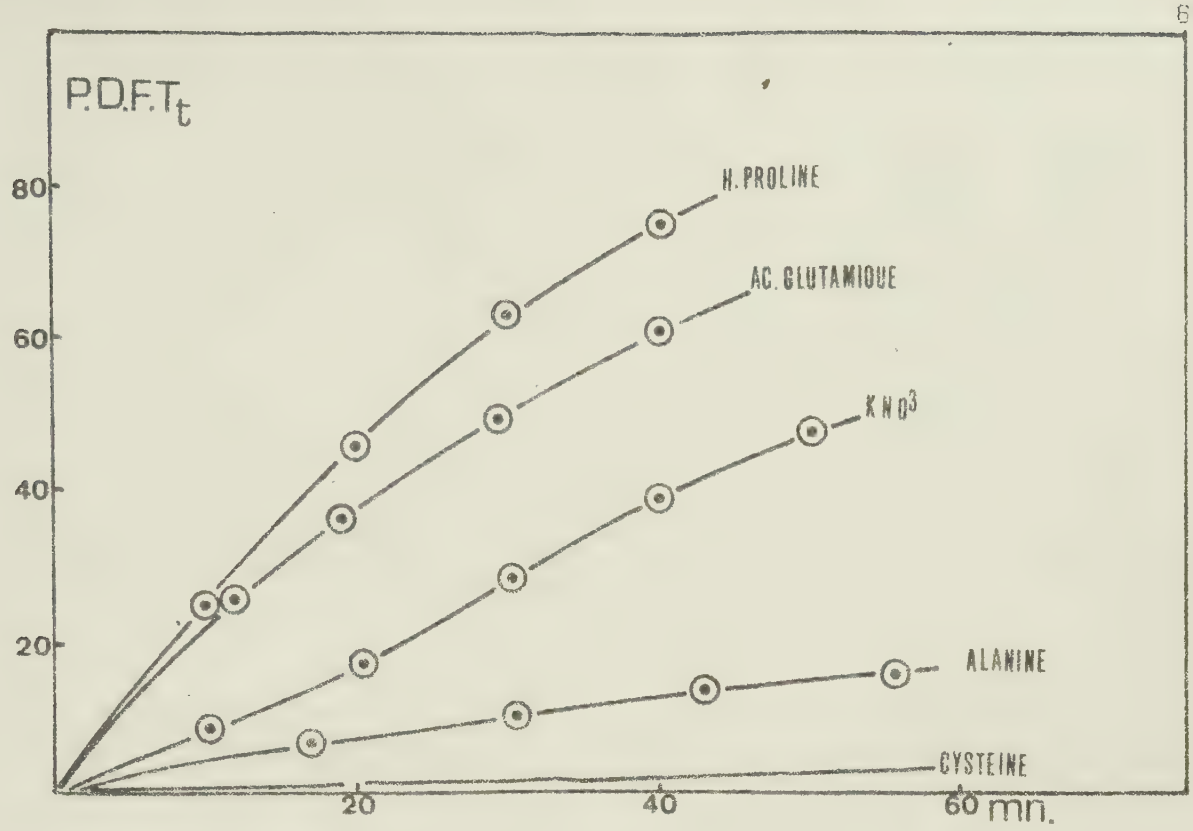


Figure (15) - Influence de la source azotée sur la sécrétion d'endo-polyméthylgalacturonase par le *Botrytis cinerea*

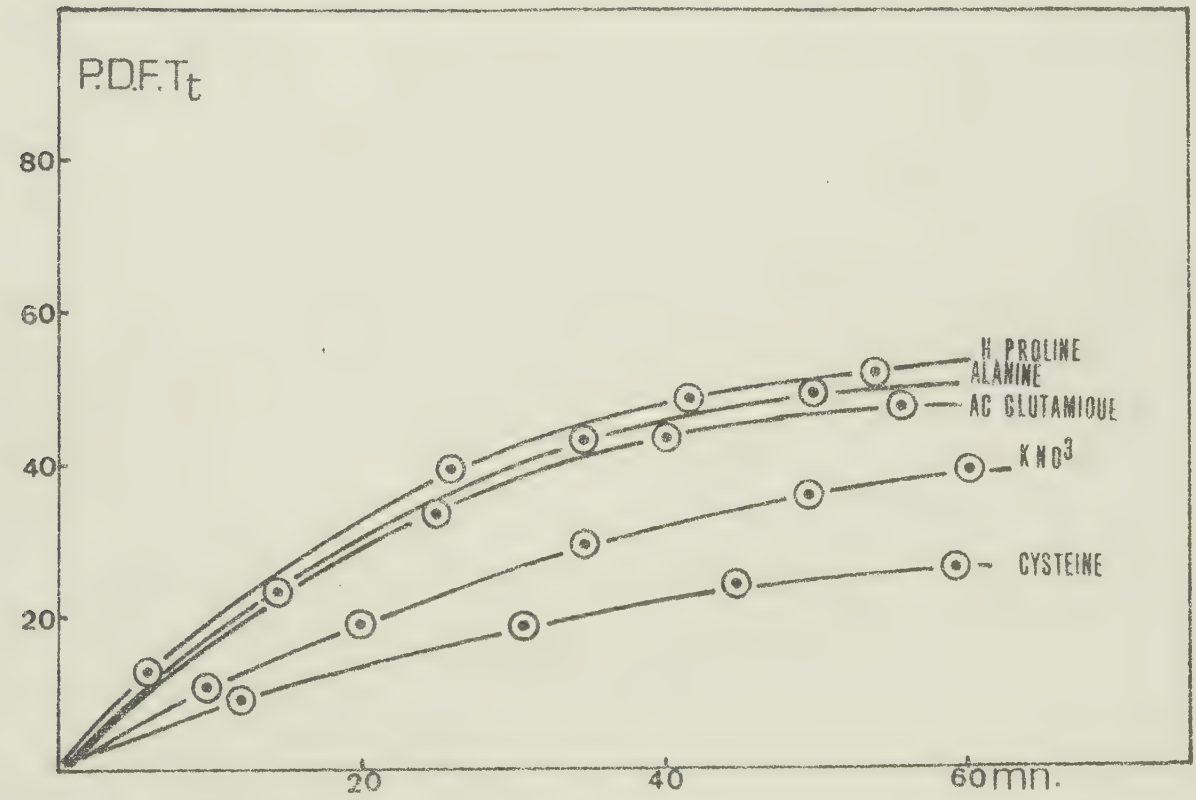


Figure (16) - Influence de la source azotée sur la sécrétion d'endo-polyméthylgalacturonase par le *Penicillium expansum*

(3) en ce qui concerne la sécrétion de la PME on peut faire les constations suivantes :

Avec le KNO_3 tous les champignons sécrétent cette enzyme. En revanche, avec la β-alanine aucun des champignons ne la produit.

Le *B. cinerea* s'est montré plus actif que les autres champignons. Le *P. malicorticis* est légèrement plus actif que le *P. alba* , mais la différence entre ces deux champignons croît d'une manière significative avec la cystéine, qui stimule les activités pectinolytiques en général chez *P. malicorticis*.

Le *P. expansum* semble ne pas produire cette enzyme dans les conditions de nos expériences. L'activité détectée si la source d'azote est KNO_3 paraît très faible.

B - Conclusion

Nous avons montré que les champignons étudiés peuvent croître sur un milieu de culture contenant, soit un nitrate, soit un acide aminé unique comme seule source azotée. Cette dernière agit sur la production quantitative des enzymes pectinolytiques. Le cas du *Penicillium expansum* en est un bon exemple. En présence de β-alanine, il produit beaucoup d'endo-PMG et d'endo-PG, cependant qu'avec la cystéine, il produit toujours abondamment l'endo-PMG, mais la sécrétion d'endo-PG s'affaiblit considérablement, en même temps, la sécrétion d'exo-PG s'intensifie. On peut alors supposer que ces acides aminés interviennent directement ou indirectement dans la constitution même de la protéine enzymatique. Un même acide aminé peut être en outre stimulant de la production d'une enzyme chez un premier champignon mais inhibiteur chez un deuxième.

Enfin, on ne peut pas faire de corrélation entre la croissance mycélienne d'un champignon et ses activités enzymatiques, si les milieux de culture sont différents.

5. ACTIVITES ENZYMATIQUES IN VIVO

La présence des enzymes pectinolytiques, cellulolytiques et xylolytiques dans le filtrat de culture n'est pas une preuve de l'intervention de ces biocatalyseurs dans la désintégration des tissus de l'hôte. De même, la non caractérisation des protéases in vitro (cas du *B. cinerea* et du *P. expansum*) ne permet pas de supposer qu'elles ne sont pas impliquées dans le procéssus de pathogénie. Nous avons donc recherché les enzymes précitées dans le complexe hôte-parasite.

5.1. ENZYMES CELLULOLYTIQUES

A - Résultats

Tableau (18) : Activités endo et exo-C_x in vivo

	Endo-C_x P.D.F.T. $_{50}$	Exo-C_x mg glucose/ml du mélange réactionnel
B. cinerea	5	0
P. expansum	14	94
P. alba	62	47
P. malicorticis	12	161
Témoin	0	0

Nous constatons la présence d'une activité endo et exo C_x dans l'extrait de tissus de pommes parasitées par les 4 champignons, sauf pour le *B. cinerea* qui s'est révélé, sous les conditions expérimentales, incapable de synthétiser l'exo-C_x.

Il n'y a pas de différences notables entre les 4 champignons en ce qui concerne la sécrétion d'exo-C_x. On note cependant que le *P. malicorticis* est plus actif que le *P. alba*, tandis que pour l'endo-C_x on remarque l'activité très élevée du *P. alba*, par rapport aux trois champignons.

Le *P. expansum* est aussi actif que le *P. malicorticis* et le *B. cinerea* a une faible activité (cf. figure 17).

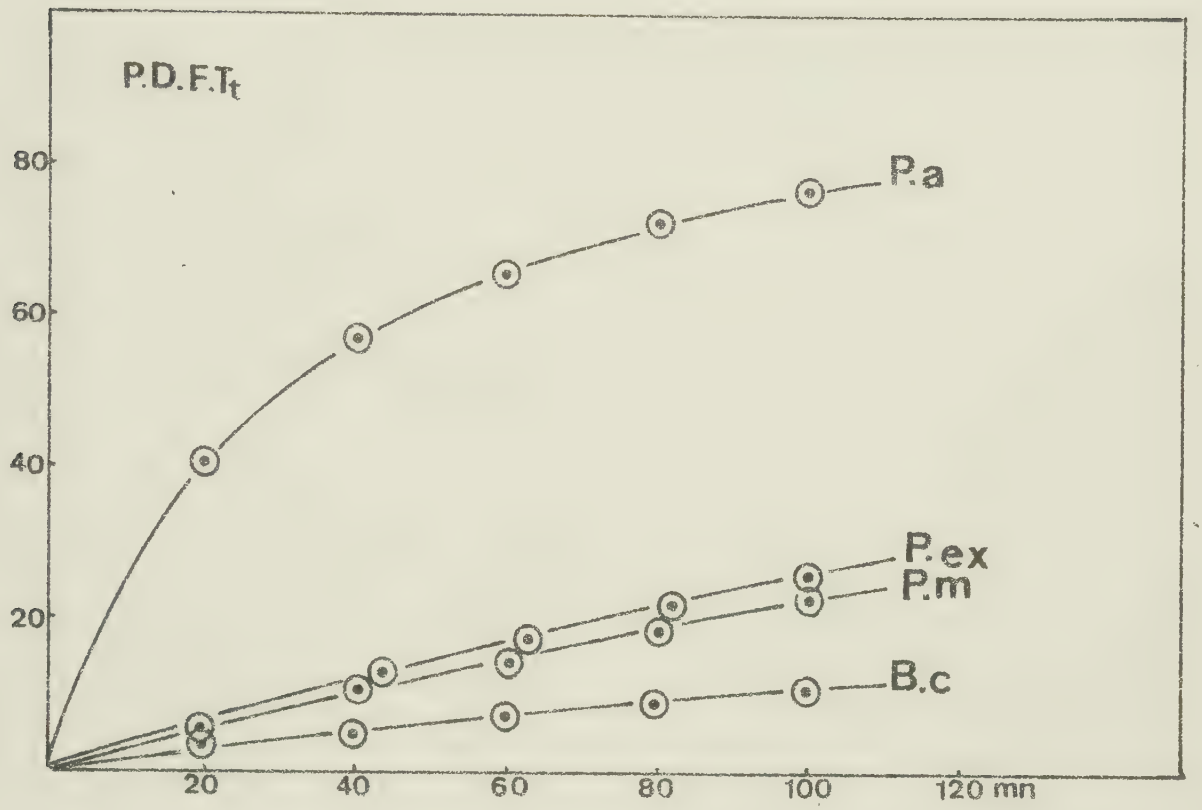


Figure (17) - Activité endo-cellulases des 4 champignons sur pourritures des pommes.

P.a = Pezicula alba

P.m = Pezicula malicorticis

P.ex = Penicillium expansum

B.c = Botrytis cinerea

B - Conclusion

Nous avons montré la présence d'une activité endo-C_x dans les tissus pourris par les 4 champignons. L'absence d'une telle activité dans les tissus sains, souligne que la sécrétion est due à la présence du champignon.

La faible sécrétion endo-C_x dans le cas du *B. cinerea* est à relier avec son mode de pénétration. En effet, ce champignon utilise deux voies ; il est à la fois inter et intracellulaire, contrairement aux trois autres espèces qui se développent intercellulairement. La pénétration intracellulaire doit donc s'effectuer par un processus surtout mécanique, sans intervention notable d'enzymes cellulolytiques.

L'activité cellulolytique importante du *P. alba* par rapport au *P. malicorticis* que nous avons soulignée in vitro, se trouve ici confirmée. Nos résultats sont en accord avec ceux de BOMPEIX (1972).

5.2. ENZYMES PECTINOLYTIQUES

52.1. Activités PME (pectineméthylestérase)

A - Résultats

	U.E (Meq acide/g poids fruits/100 mn.
B. cinerea	235,0
P. expansum	14,1
P. alba	42,5
P. malicorticis	44,7
Tissus sains	32,5

Les résultats d'analyses des tissus sains et des tissus parasités montrent que, dans les tissus sains de pomme, préexiste une activité PME notable. Cette activité est fortement accrue dans les tissus du complexe hôte-parasite (sauf dans le cas du *P. expansum*.) L'activité du *B. cinerea* est 6 fois plus grande que pour les autres parasites. On note que l'activité du *P. malicorticis* est très légèrement supérieure à celle du *P. alba*. EDNEY (1964) a trouvé l'inverse.

B - Conclusion

Nous avons signalé que l'activité PME est fortement accrue dans les tissus du complexe hôte-parasite (sauf dans le cas du *P. expansum*). Faut-il penser que l'accroissement d'activité est dû à la sécrétion de l'enzyme par le parasite ? Ou qu'il est dû tout simplement à l'activation et à la libération de la PME de l'hôte adsorbée fortement par la membrane cellulaire par suite de l'action parasitaire ? Dans ce cas comment interpréter la baisse de l'activité dans le cas du *P. expansum* ?

Il est vrai qu'on peut attribuer une partie de l'augmentation de l'activité à la sécrétion de l'enzyme par les parasites. Ceux-ci se sont révélés capables de la synthétiser in vitro. D'autre part, la dialyse du filtrat des tissus sains et celle des tissus pourris montre en général une baisse d'activité, qui accroît la différence entre l'activité des tissus sains et celle des tissus infectés, ce qui montre que les deux enzymes sont d'origine différente.

Nous avons noté que la concentration de la PME extraite à l'aide d'un extracteur est plus élevée que dans le cas où l'opération se fait seulement avec de l'eau. La PME adsorbée par la membrane peut donc être libérée par l'augmentation de la concentration en ions. En effet on a noté que l'augmentation d'activité métabolique qui se produit par l'interaction entre l'agent pathogène et l'hôte, pourrait mobiliser les sels vers les régions malades. (BATEMAN, 1964) et libérer la PME de l'hôte.

La baisse d'activité, dans le cas du *P. expansum*, peut être due à une destruction de l'enzyme.

L'activité PME du *Botrytis cinerea* est accompagnée d'une faible activité PMG et une activité endo-PG assez élevée. Notre conception sur le mode d'action de ce parasite (cf. résultats in vitro) se trouve donc confirmée.

La PME sécrétée par les champignons peut jouer un rôle dans la destruction des substances pectiques, tout en déméthylant la pectine. En effet l'endo-PG est plus active sur de la pectine déméthylée; ainsi la PME pourrait agir en synergie avec la PG dans la destruction des composés pectiques de l'hôte.

La difficulté de préciser quantitativement l'origine de l'accroissement de l'activité de cette enzyme dans la plante malade ne nous permet pas de préciser le rôle exact de celle-ci dans la pathogénèse.

52.2. Polyméthylgalacturonases et Polygalacturonases

A - Résultats

Tableau (20) : Activité endo-PMG in vivo

	P.D.F.T. 50 mn.
B. cinerea	9
P. expansum	26
P. alba	14
P. malicorticis	20
Témoin (tissu sain)	0

L'analyse des tissus pourris par les 4 champignons étudiés, montre la présence d'une activité endo-PMG (cf. figure 18). Le *P. expansum* semble être le plus actif dans la sécrétion de cette enzyme ; son activité est 3 fois plus grande que celle du *B. cinerea*. Le *P. malicorticis* est plus actif que le *P. alba*. Dans les tissus sains, nous n'avons pas pu mettre en évidence une activité semblable.

Tableau (21) : Activité endo-PG et exo-PG in vivo

	Endo-PG P.D.F.T. 50 mn.	Exo-PG mg glucose/0,259 pourriture fruit
B. cinerea	40	0,520
P. expansum	30	0,450
P. alba	45	0,500
P. malicorticis	75	0,600
Témoin	0	0

Nous constatons la présence d'une activité endo et exo-PG dans l'extrait de tissus de pommes invahies par les 4 champignons.

L'activité exo-PG est relativement comparable pour les 4 champignons. Cependant, on constate, en ce qui concerne l'endo-PG (cf. figure 19) que les parasites latents sont plus actifs que les parasites de blessures. Parmi

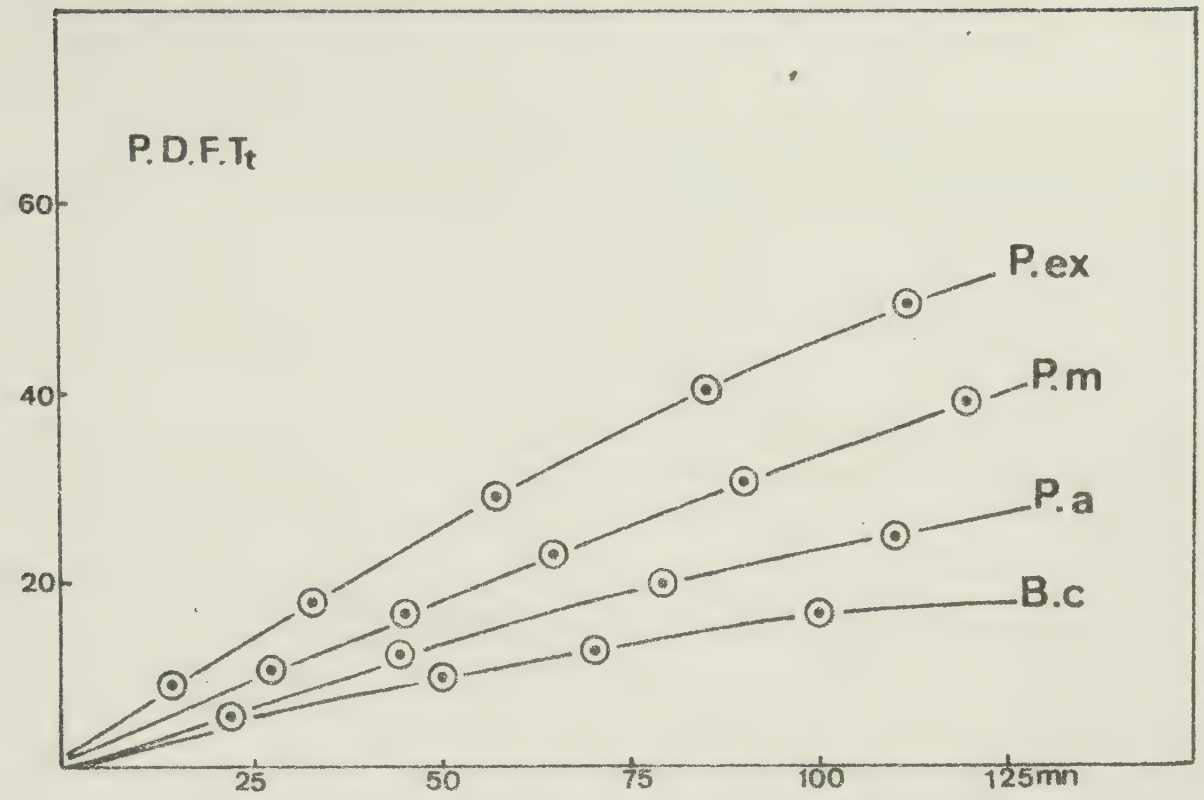


Figure (18) - Activités endo-polyméthylgalacturonases des 4 champignons sour pourritures des pommes.

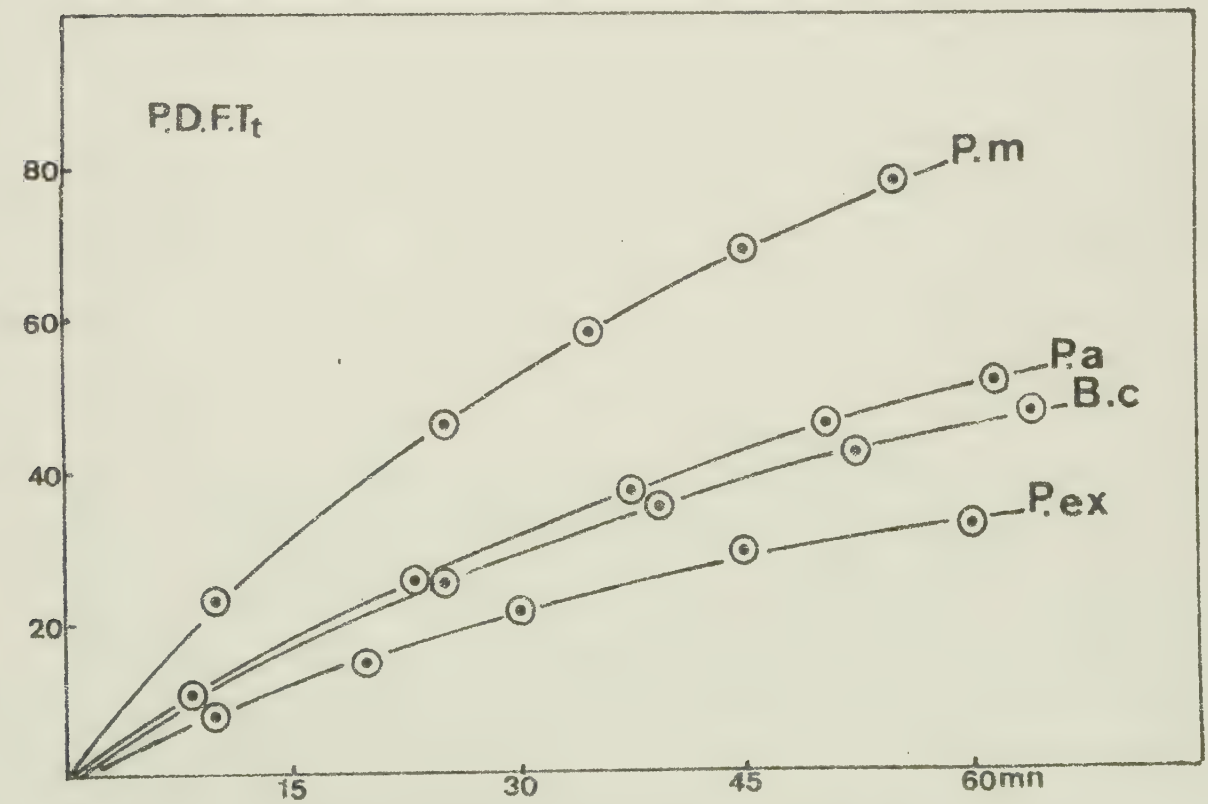


Figure (19) - Activités endo-polygalacturonase des 4 champignons sur pourritures des pommes.

les premiers, le *P. malicorticis* est plus actif que le *P. alba*. D'autre part, pour les parasites de blessures, le *B. cinerea* est plus actif que le *P. expansum*.

B - Conclusion

Comme nous l'avons déjà montré in vitro, les parasites les plus pathogènes sécrétent plus d'enzymes pectinolytiques (cas du *P. alba* et du *P. malicorticis*).

La faible activité endo-PMG de *B. cinerea* , est accompagnée d'une activité endo-PG relativement élevée.

Nous ne pouvons pas établir une corrélation nette entre le pouvoir pathogène et l'exo-PG, car l'activité décelée est pratiquement comparable pour tous les champignons expérimentés.

Nous avons montré que les parasites latents sont moins actifs en fin de culture (in vitro) que les parasites de blessures. In vivo , cette différence est difficile à mettre en évidence. 2 facteurs peuvent être en cause : 1/ le facteur temps n'a pas été pris en considération pendant le développement des champignons sur pommes ; notre but est d'avoir des taches de pourriture assez bien développées pour l'obtention des préparations enzymatiques. On obtient ces taches plus rapidement dans le cas des parasites de blessures.
2/ la réponse de l'hôte au parasite et à ses armes enzymatiques n'est pas toujours la même.

Les produits d'oxydation des composés phénoliques sont considérés comme inhibiteurs des pectine-glycosidases.WALKER (1970) a expliqué, en partie, la grande vitesse à laquelle le *Penicillium expansum* envahit les tissus de pommes, en mettant en évidence un inhibiteur de l'oxydation de l'acide chlorogénique, de la catéchine, et du catéchol dans le filtrat de culture de ce champignon. COLE (1956), n'a pas réussi à mettre en évidence des activités pectinolytiques dans les tissus de pommes pourries par le *Sclerotinia fructigena*, bien que ce champignon soit actif in vitro. Il a attribué cet effet aux composés phénoliques, identifiés en 1961 (COLE et WOOD) comme étant des leuco-anthocyanes converties en autres composés à la suite de l'action des polyphénol-oxydases.

La baisse de concentration des substances phénoliques pendant les différents stades de la maturation a été liée à l'augmentation de la sensibilité des pommes à l'égard du *P. alba* et du *P. malicorticis* (HULME et EDNEY, 1960 ; MLAIKI, 1970)

5.3. ENZYMES HEMICELLULOLYTIQUES (l'exo-xylanase a été seule étudiée)

A- Résultats

Tableau (22) : Activité Exo-xylanase in vivo

	U.E./0,25 g Poids frais tissus parasités
B. cinerea	0
P. expansum	229
P. alba	22
P. malicorticis	351
Témoin	0

Nous constatons l'absence de cette enzyme dans les tissus sains de pomme, ainsi que dans ceux parasités par le *B. cinerea*. Le *P. malicorticis* est 15 fois plus actif que le *P. alba*, et est légèrement plus actif que le *P. expansum*.

B - Conclusion

Bien que l'utilisation nutritionnelle du xylane par les champignons dans les tissus infectés soit peu importante, l'hydrolyse de quantités limitées peut altérer les propriétés physiques de cette substance. Ceci a pour conséquence d'influencer la fonction du xylane comme un constituant structural de la membrane cellulaire. L'importance de l'hydrolyse du xylane sur la sévérité de la maladie est difficile à évaluer, l'absence de cette activité dans le cas du *B. cinerea* , bien que l'enzyme produite par ce champignon soit détectée in vitro. On peut poser la question de savoir s'il existe une inhibition de la sécrétion de cette enzyme in vivo, ou est-ce que la faible hydrolyse de la cellulose observée à la fois in vitro et in vivo dans le cas de ce champignon, ne laisse pas l'accès libre à la xylanase d'agir sur son substrat. Le résultat obtenu semble montrer que la présence d'enzymes hémicellulolytiques est indépendante du phénomène de latence. Cependant la xylanase

détectée dans le cas du *P. malicorticis* est beaucoup plus active que celle du *P. alba* qui est connu comme étant moins pathogène que le premier.

5.4. ENZYMES PROTEOLYTIQUES

Le milieu 2 (cf. préparation des substrats de l'activité enzymatique) contenant du merthiolate, est coulé dans des boîtes de Pétri à raison de 15ml par boîte.

Des fragments calibrés de tissus de pommes pourries et congelées (5 mm de diamètre, 5 mm d'épaisseur) sont prélevés à différents niveaux de la progression mycélienne, et sont déposés sur la surface gélosée des boîtes de Pétri. Après 24 heures d'incubation à 30°, les zones de lyse dues à la présence d'enzymes protéolytiques dans les fragments de tissus pourris sont révélées à l'aide d'une solution aqueuse à 5 % d'acide trichloracétique. Un prélèvement identique des tissus sains est traité de la même manière et sert de témoin.

Nous avons employé 2 substrats protéiques : la gélatine et la peptone. Les résultats sont exprimés figure 29. Chaque chiffre représente le diamètre moyen en mm. de la zone de lyse, en utilisant 5 mesures. Les cercles entourant les chiffres indiquent les points de prélèvement.

A - Résultats

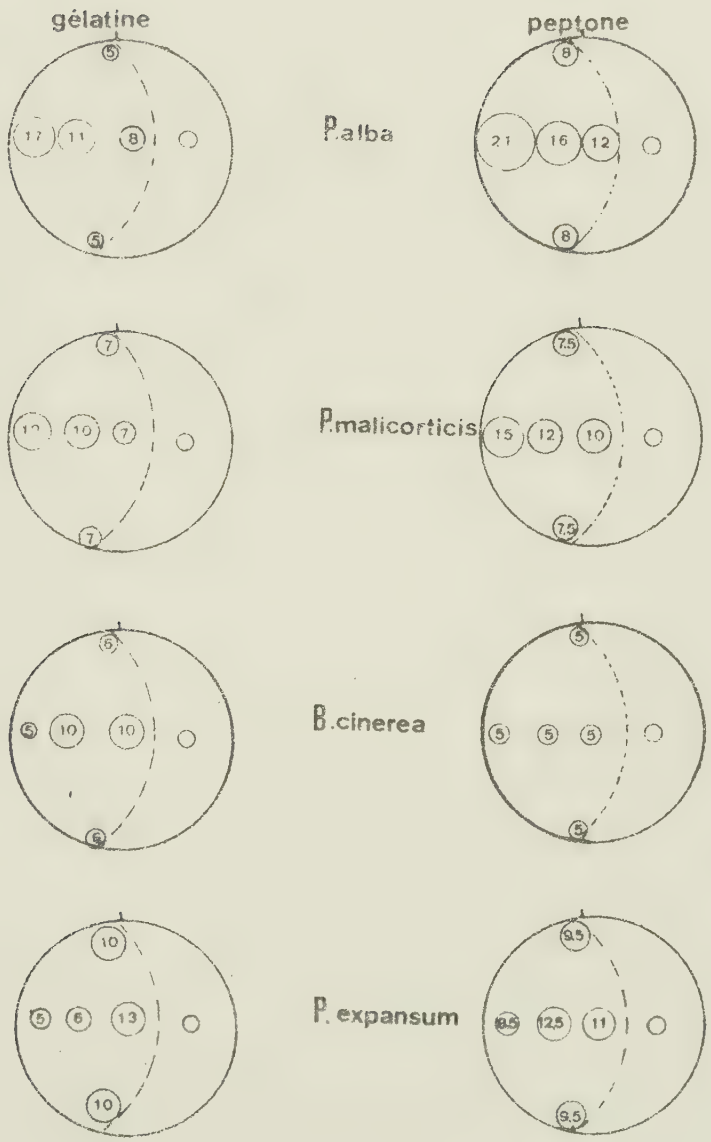
Nous constatons que les enzymes protéolytiques présentes dans les lésions provoquées par les parasites latents sont plus actives que celles provoquées par les parasites de blessures. Ces enzymes sont plus actives sur gélatine que sur peptone à l'exception de celles du *B. cinerea*.

Parmi les parasites latents, *P. alba* est plus actif que *P. malicorticis*. Chez les parasites de blessures c'est le *P. expansum* qui est le plus actif.

Les tissus sains ne manifestent aucune activité.

Figure (29) - Activités protéolytique des tissus de pommes pourries et congelées.

Chaque chiffre représente le diamètre moyen en mm de la zone de lyse, pour 5 mesures. Les cercles entourant les chiffres indiquent les endroits du prélèvement.



B - Conclusion

Nous avons noté la présence d'une activité protéolytique dans les fragments de tissus parasités par les 4 champignons.

Comme nous l'avons noté in vitro , l'activité du *Pezicula alba* est plus importante que celle du *P. malicorticis*. BOMPEIX (1972), utilisant une méthode viscosimétrique à pH alcalin avec la gélatine comme substrat, a trouvé l'inverse.

Nous observons d'autre part, que les parasites de blessures sécrétent ces enzymes en avant du front de croissance tandis que les parasites latents sécrétent ces enzymes en arrière de ce front. Ce phénomène peut être dû à la différence de vitesse de croissance entre ces deux groupes de parasites. Ce qui nous paraît certain, c'est que les parasites latents attaquent les protéines plus facilement que les parasites de blessures.

6. ACTIVITES ENZYMATIQUES SUR CULTURE DE TISSUS

Des cals de mésocarpe des pommes (cultivar "Golden delicious" et "Winston") âgés de 3 mois, nous ont été communiqués par le laboratoire de physiologie pluricellulaire. 3 cals de chaque cultivar sont contaminés par le *Pezicula alba* ou *P. malicorticis*, 3 autres cals sains servent de témoin. Les cals, après inoculation, sont maintenus à 4° pendant 70 jours, pour favoriser le développement mycélien de ces deux champignons. Ils sont ensuite broyés en vue de l'obtention des préparations enzymatiques.

Le broyage, les méthodes et les substrats utilisés pour la détermination de l'activité enzymatique, sont les mêmes que ceux employés in vivo.

A - Résultats

On constate que les activités endo-polyméthylgalacturonase, endo-polygalacturonase, et endo-C_x sont plus importantes dans le cas du *Pezicula malicorticis* qui est d'ailleurs plus pathogène que le *P. alba*.On remarque également que ces mêmes activités sont plus importantes sur cultivar "Golden delicious" (en général plus sensible à l'attaque des deux champignons) que sur cultivar "Winston".

Les activités exo-C_x et exo-xylanase sont du même ordre de grandeur pour les deux champignons alors que l'exo-PG du *Pezicula alba* est sensiblement plus importante que celle du *P. malicorticis*.

Pour la pectine méthylestérase, nous avons constaté l'existence d'une activité dans les cals sains. Cette activité est accrue dans le complexe hôte-parasite. Le rapport cals parasités/cals sains est plus élevé dans le cas du *P. alba*. Comme il est impossible, pour le moment, de séparer quantitativement et avec certitude l'enzyme de deux origines, le rôle de cette enzyme dans l'expression du pouvoir pathogène reste à vérifier.

Tableau (23) : Activité PME

	U.E (Meq acide/g poids frais x 100 mn			
	Winston	cals parasités / cals sains	Golden	Cals parasités / Cals sains
Témoin	225		136	
Pezicula alba	304	1.35	231	1.65
P. malicorticis	235	1.04	175	1.28

Tableau (24) : Activité endo-C_x

	U.E/ml de filtrat ($1/T_{50}$ x 100)	
	Winston	Golden delicious
Témoin	0	0
P. alba	1.51	3
P. malicorticis	6.0	6.6

Tableau (25) : Activité exo-C_x

	U.E/ (mg glucose/ml mélange réactionnel	
	Winston	Golden délicious
Témoin	78	47
P. alba	625	672
P. malicorticis	678	703

Tableau (26) : exo-xylanase

	U.E/ml de filtrat (mg xylose/ml mélange réactionnel	
	Winston	Golden delicious
Témoin	13	26
P. alba	608	600
P. malicorticis	782	635

Tableau (27) : Activité endo-PMG

	U.E/ml de filtrat ($1/T_{50} \times 100$)	
	Winston	Golden delicious
Témoin	0	0
P. alba	1.16	1.34
P. malicorticis	4.17	4.54

Tableau (28) : Activité endo-PG

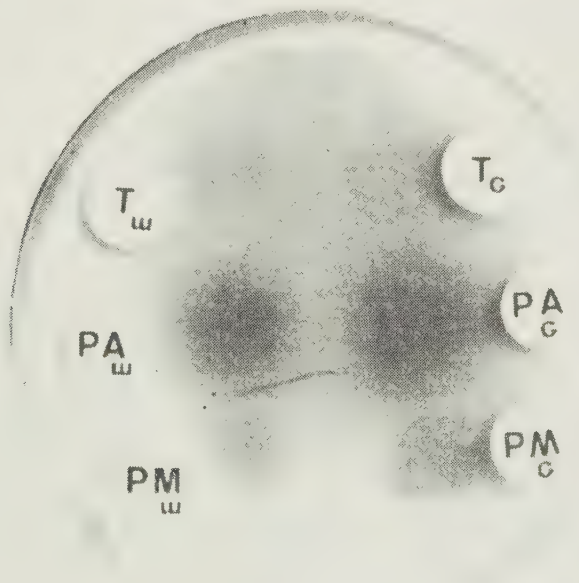
	U.E/ml de filtrat ($1/T_{50} \times 100$)	
	Winston	Golden delicious
Témoin	0	0
P. alba	0.77	0.82
P. malicorticis	1.00	1.66

Tableau (29) : Activité exo-PG

	U.E/ 0,25 g poids frais	
	Winston	Golden delicious
Témoin	265	203
P. alba	640	594
P. malicorticis	360	297

Tableau (30) : Activités protéolytiques

		Diamètre de la zone hydrolysée	
Cultivar	Parasites	Peptone	Gélatine
Golden delicious	*P. alba*	20 ± 0.3 mm	18 ± 0.35 mm
	P. malicorticis	14 ± 0.35 mm	13 ± 0.5 mm
Winston	*P. alba*	15 ± 0.5 mm	13,5 ± 0,5 mm
	P. malicorticis	13 ± 0,5 mm	13 ± 0,5 mm



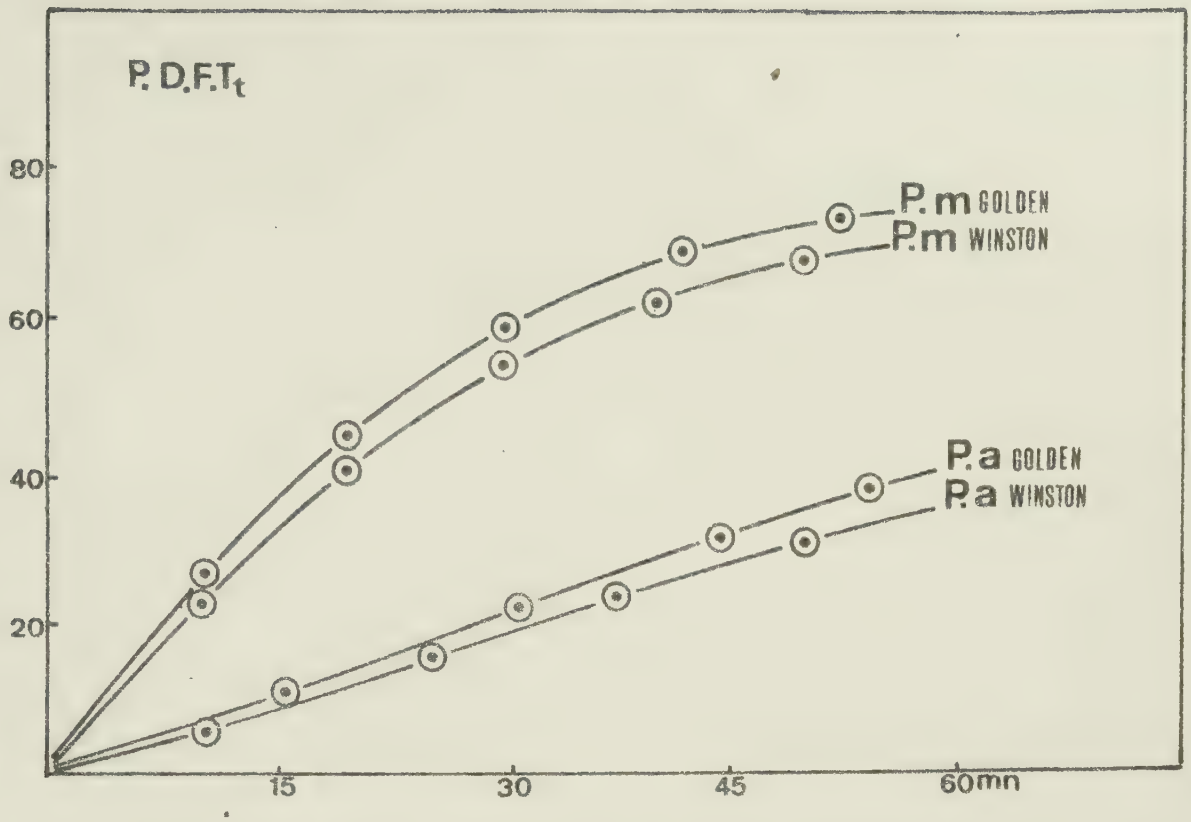


Figure (21) - Activités endo-polyméthylgalacturonases de *Pezicula alba* et de *P. malicorticis* sur culture des tissus de pomme "Golden et Winston"

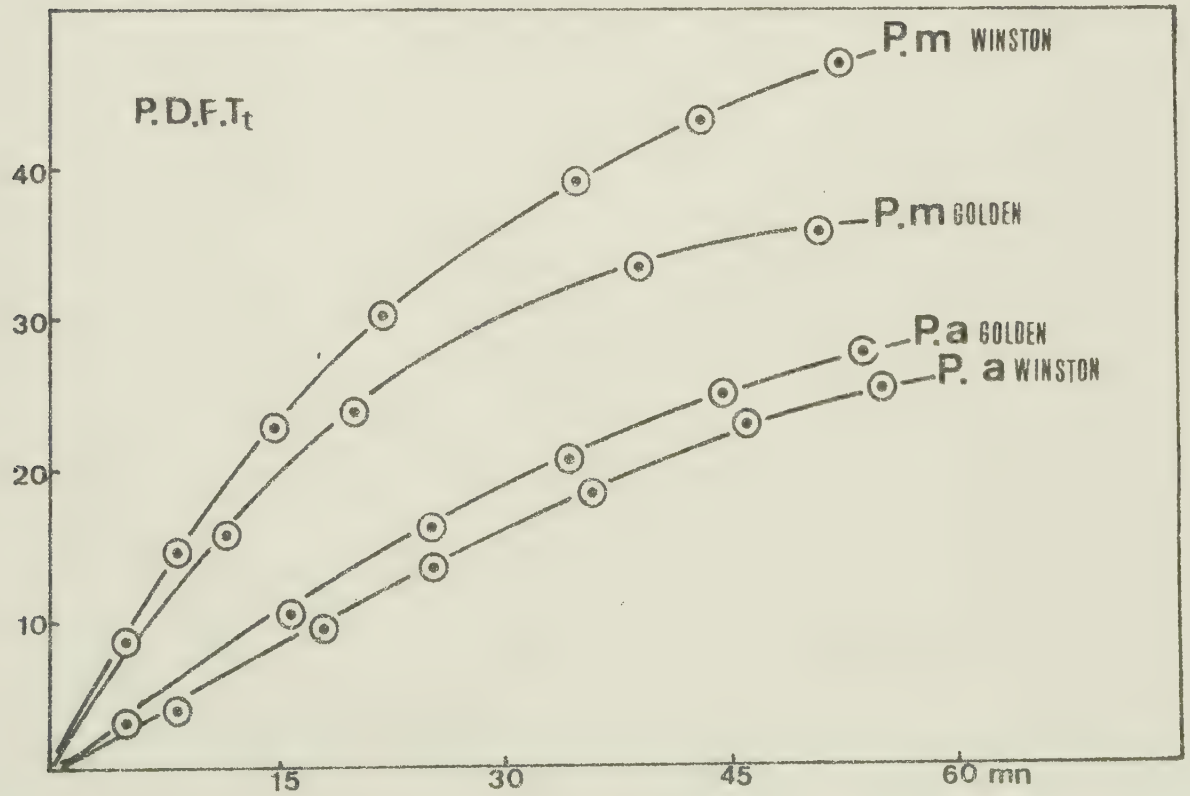


Figure (22) - Activités endo-polygalacturonases de *P. alba* et de *P. malicorticis* sur culture des tissus de pomme "Golden et Winston".

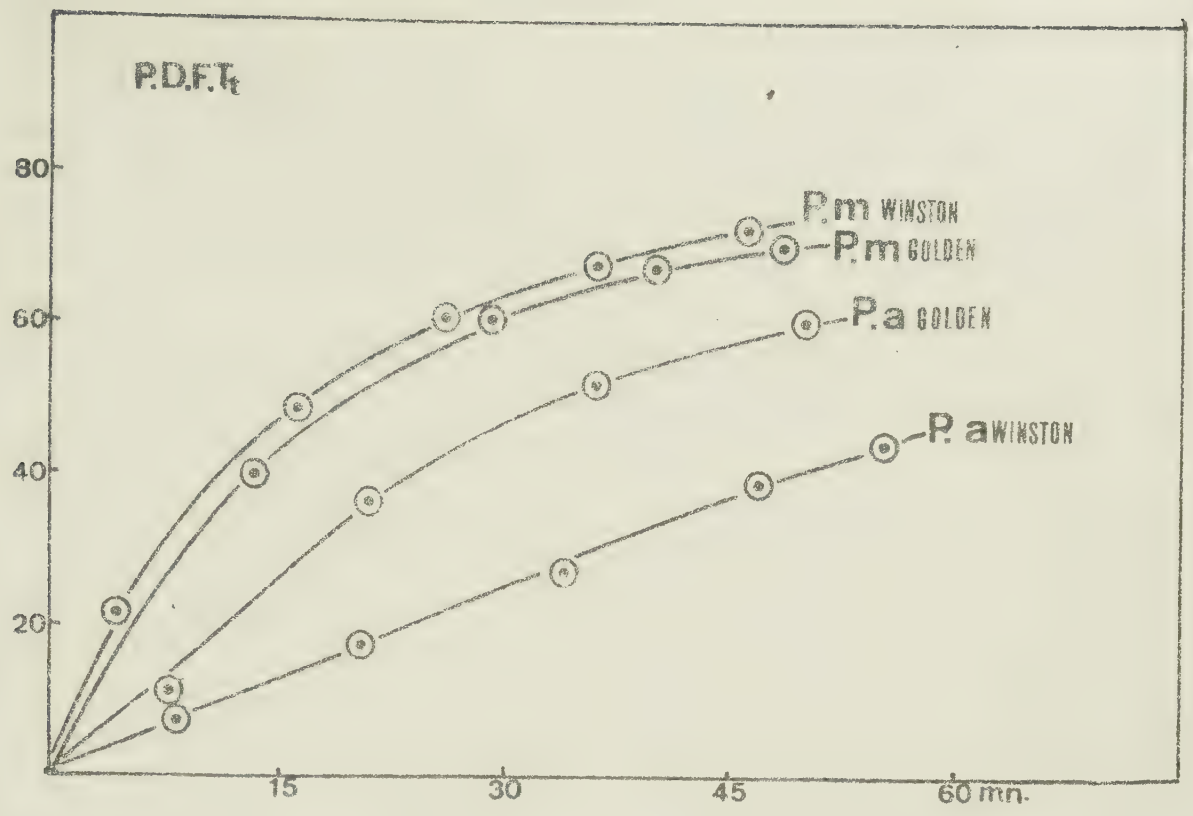


Figure (20) - Activités endo-cellulases de *Peziculа alba* et de *P. malicorticis* sur culture des tissus de pomme "Golden et Winston".

Nous avons aussi décelé la présence d'une activité protéolytique (au moyen de pastilles saturées de filtrat de culture que l'on dépose sur un milieu gélosé à base de gélatine ou de peptone). D'après nos résultats, figurés dans le tableau (30) nous pouvons faire les constatations suivantes

- le *Pezicula alba* est plus actif que le *P. malicorticis*.
- l'activité sur cultivar Golden est plus importante que sur cultivar Winston
- la réaction est plus nette sur peptone que sur gélatine.

B - Conclusion

Nous avons retrouvé, en examinant l'extrait des cals pourris, toutes les activités que nous avons montrées in vivo. La différence entre le *Pezicula alba* et le *P. malicorticis* est plus nette ici. L'activité endo-PMG pour *P. malicorticis* est 7 fois plus importante qu'in vivo ; elle est seulement 4 fois plus importante pour *P. alba* alors que l'activité endo-PG reste du même ordre de grandeur. Ce qui est frappant c'est l'augmentation très importante de l'activité endo-C_x pour *P. malicorticis*. En effet, elle est 15 fois plus grande que celle rencontrée in vivo ; tandis qu'elle reste du même ordre de grandeur pour le *P. alba*. L'activité protéolytique est toujours plus importante pour le *P. alba*, ce qui confirme les résultats concernant cette activité in vitro, et in vivo.

7. DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES

Les champignons pénètrent dans les plantes à travers les cuticules intactes, les ouvertures naturelles comme les stomates et les lenticelles, les organes de faible résistance comme les nectaires et les hydathodes, enfin par les blessures.

Beaucoup d'entre eux peuvent pénètrer directement au travers de la cuticule uniquement par un processus mécanique, ils peuvent d'ailleurs traverser des membranes synthétiques (paraffine, nitrocellulose, polystyrène méthacrylate) qui ne sont pas dégradées par les parasites (MARTIN et JUNIPER, 1970). C'est ainsi que dans le cas du *Botrytis cinerea* (VIENNOT-BOURGIN, 1969) le franchissement cuticulaire s'accomplit par la production d'un filament "perceur" cylindrique, très étroit, dans lequel la pression osmotique est de 7 atmosphères. Au contact des couches épidermiques, les actions mécaniques ne sont pas interrompues, en raison de la pression osmotique, qui, dans les hyphes, est très supérieure à celle des cellules-hôtes. Ce mode de pénétration se double souvent de la sécrétion de substances dissolvantes ou toxiques.

Actuellement et de plus en plus, on doit reconnaître que les champignons sont producteurs d'enzymes et de toxines, qui, lorsqu'elles sont appliquées à des tissus vivants, endommagent les cellules. Pour GAUMANN (1954) les microorganismes ne sont pathogènes que s'ils sont toxigènes. Il incluait aussi dans ce terme les enzymes.

°

° °

Parmi les altérations que nous avons été à même d'étudier dans des conditions favorables de laboratoire, nous nous sommes attaché à une meilleure conception de ce que l'on désigne sous le terme de "pourriture" des fruits au cours de la période de leur conservation en chambre réfrigérée.

Ces altérations ont une conséquence économique certaine. Les différents auteurs de nombreux pays dont nous avons établi la bibliographie en consultant leurs travaux, estiment que les pertes causées par les pourritures varient entre 10 et 48 %.

Dans une première étude, nous avons cherché à préciser :

1 - l'origine des premiers symptômes superficiels,

2 - le mode de progression des hyphes dans les tissus.

On peut en effet retrouver au centre des taches brunâtres dues au développement des parasites fongiques, soit une blessure parfois difficile à déceler, soit une lenticelle. Nous n'avons jamais observé de pénétrations directes au travers de la cuticule.

Certains parasites se développent préférentiellement à partir de blessures fraîches, qui leur apportent les nutriments nécessaires, bien que le nombre de spores pathogènes puisse être faible, le développement de la pourriture est immédiat. C'est le cas du *Penicillium expansum*, dont les spores sont toujours présentes dans l'air des chambres de conservation. On utilise dans ce cas l'expression de "parasite de blessure".

En revanche les spores d'autres parasites dits latents, bien qu'abondantes à la surface des fruits ne causent pas de pourritures au commencement de la période de conservation.

L'essentiel des spores du *Pezicula alba*, par exemple, est déposé sur les pommes par les eaux de pluie, dans les quelques semaines précédant la récolte. Leur nombre peut dépasser 8 000 sur un seul fruit (BOMPEIX et MORGAT, 1970). Très rapidement il se forme un mycélium issu de la germination des spores, au niveau des cavités lenticellaires comme de l'épiderme. Les hyphes sont en contact avec les cellules vivantes, car les lenticelles sont ouvertes pour la plupart,cependant l'état physiologique du fruit s'oppose à leur développement.

Dans le cas du *Pezicula malicorticis*, le contact avec les cellules vivantes peut être encore plus précoce. EDNEY (1958) a étudié la phase initiale du développement du champignon sur des pommes Cox's Orange pippin. Dans le jeune fruit, sur lequel les lenticelles sont à peine formées, les hyphes se développent quelquefois dans la cavité sous-stomatique, mais à ce stade, ils ne se répandent pas dans les cellules corticales situées autour de cette cavité. Plus tard, alors que les lenticelles sont formées, les appressoria apparaissent dans la couche subérifiée qui se développe au-dessous de la cavité sous-stomatique, mais les hyphes ne pénètrent pas dans les cellules.

D'après BOMPEIX (1972), le mécanisme responsable de la latence peut être à la fois de nature physique (résistance des membranes à la pénétration), trophique et toxique.

Nous avons **ainsi** choisi de comparer les deux parasites latents précités, le *Pezicula malicorticis* et le *P. alba* avec deux parasites de blessures, le *Penicillium expansum* et le *Botrytis cinerea* . Cela nous a conduit à utiliser des pommes du cultivar "Golden delicious" pour avoir un support expérimental constant. Nous avons alors vérifié que la progression des hyphes de ces 4 champignons est intercellulaire . Seul le *Botrytis cinerea* émet exceptionnellement des prolongements intra-cellulaires.

°

° °

Nous avons étudié, tout d'abord, la sécrétion enzymatique des parasites in vitro :

A / - Les 4 champignons synthétisent les enzymes nécessaires à la destruction des constituants chimiques de la paroi cellulaire : enzymes cellulolytiques, pectinolytiques, hémicellulolytiques. Ces enzymes synthétisées dans le mycélium sont excrétées plus ou moins rapidement dans le milieu de culture. Leur synthèse nous a paru de nature adaptative, et nécessite la présence de substances spécifiques pour se réaliser.

Les parasites latents tels que le *Pezicula alba* et le *P. malicorticis* (moins destructeurs dans le temps que les parasites de blessures) sécrétent leurs enzymes plus lentement que les parasites de blessures (*Botrytis cinerea* et *Penicillium expansum*). Chez ces derniers, le pH élevé favorise une sécrétion généralement plus rapide des enzymes cellulolytiques et pectinolytiques. Ce retard pourrait être une des causes du phénomène de latence.

En effet le pH des pommes s'élève progressivement de 3,0 à 4,0 au cours de la conservation.

°

° °

Alors que les parasites latents sécrétent plus d'enzymes cellulolytiques que les parasites de blessures, ces derniers sécrétent par contre davantage d'enzymes pectinolytiques et hémicellulolytiques. Cette observation nous a permis d'envisager l'existence d'une relation entre le pouvoir pathogène et l'activité de ces dernières enzymes. D'autant plus que le *Pezicula malicorticis*, reconnu plus pathogène que le *P. alba* (EDNEY, 1964 ; BOMPEIX, 1972), est aussi plus actif en ce qui concerne la sécrétion de ces enzymes.

Ce lien n'est pas évident dans le cas d'enzymes protéolytiques puisque nous n'avons pas trouvé ces enzymes chez le *Penicillium expansum* et le *Botrytis cinerea* in vitro. De plus le *P. alba* est plus actif concernant la sécrétion de ces enzymes, bien qu'il soit moins pathogène que le *P. malicorticis*.

La forme d'azote employée, en milieu de culture, joue un rôle important sur la croissance mycélienne, et la sécrétion quantitative et qualitative d'enzymes pectinolytiques. Certains acides aminés semblent être stimulants, comme l'acide glutamique et l'hydroxy-proline présent dans les parois cellulaires (LAMPORT, 1965), d'autres paraissent inhibiteurs (cystéine et β-alanine). Nous sommes d'accord avec la conception selon laquelle l'adjonction de certains acides aminés aux sites de l'infection peut stimuler la pathogénèse (BOMPEIX, 1970). En effet, les protéases pourraient jouer un rôle important au début de l'infection en libérant les acides aminés nécessaires à la synthèse des enzymes extracellulaires par l'agent pathogène.

B/ - In vivo : nos résultats tiennent compte d'essais sur fruit entier (B_1) et sur culture de tissu de pomme (B_2).

B_1- à l'exception de la pectineméthylestérase, les tissus ne contiennent pas d'autres enzymes. Les activités enzymatiques détectées dans les tissus parasités sont donc essentiellement dues à l'excrétion de ces enzymes par l'agent pathogène.

Comme précédemment, in vitro, nous n'avons pas trouvé de lien entre les activités cellulolytiques et le pouvoir pathogène. Le rôle des cellulases dans la pathogénèse peut être secondaire dans le cas précis des pommes. Ce rôle a cependant été pris en considération dans la destruction tissulaire. C'est ainsi qu'elles jouent un rôle essentiel dans l'envahissement des tissus de Concombre par le *Cladosporium cucumerinum* ELL. et ARTH., (STRIDER et WINSTEAD, 1961). En revanche, un lien étroit entre les enzymes pectinolytiques (spécialement l'endo-polyméthylgalacturonase), hémicellulolytiques, et le pouvoir pathogène semble se confirmer.

Les parasites latents, sont plus actifs que les parasites de blessures concernant les activités protéolytiques. Ce phénomène n'est pas lié directement au pouvoir pathogène, car le *Pezicula alba* s'est révélé plus actif que le *P. malicorticis*. Cette étude montre un mode d'excrétion des enzymes différent selon qu'il s'agit de parasites de blessures ou de parasites latents. Les premiers sécrétent ces enzymes en avant du front de croissance des pourritures, les derniers, les sécrétent en arrière de ce front.

Le *Botrytis cinerea* semble avoir un mécanisme d'attaque enzymatique différent de celui des autres champignons. Il manifeste une faible activité cellulolytique qui ne semble pas utile à sa pénétration tissulaire. Sa pénétration intra-cellulaire doit donc être surtout mécanique. Sa faible production en endo-polyméthylgalacturonase est compensée par une activité pectinéméthylestérase, et une activité endo-polygalacturonase très importante.

B_2 - Une étude enzymatique complémentaire a été faite sur cultures de mésocarpe de pomme, en comparant seulement les effets des deux espèces de *Pezicula*.

Le *Pezicula malicorticis* s'est révélé plus actif que le *P. alba* à l'exception de l'action protéolytique. De plus les activités enzymatiques sur cals de tissu appartenant au cultivar "Golden delicious" (la plus sensible à l'attaque de ces deux parasites) sont plus prononcées que celles sur cals du cultivar "Winston". La différence d'activité entre ces deux champignons qui a été constatée in vivo sur des fruits et in vitro sur milieux synthétiques, est exaltée, ce qui semble confirmer le rôle de ces enzymes dans la pathogénèse.

°

° °

Les actions enzymatiques sur les constituants des parois cellulaires des tissus de pomme envahis par divers champignons parasites, se traduisent finalement par une dissociation tissulaire, suivie de la séparation des cellules les unes des autres. Les cellules meurent, le tissu devient hétérogène, l'eau se répand entre les espaces intercellulaires. Ce faciès est le plus caractéristique de ce qui est désigné couramment sous le nom de "pourriture molle".

En outre, la nature et la quantité des enzymes produites dans les tissus expliquent bien les symptomes de pourritures très liquides, des parasites de blessures, et celles plus fermes par suite d'une moindre dégradation des composés pectiques dans le cas des parasites latents.

BIBLIOGRAPHIE

ALBERSHEIM (P), NEWKOM (H), DEUEL (H).1960 - Uber die bildung von ungesattigten abbauprodukten durch ein pektinabbauendes enzyme. Helv. Chim. Acta , 43, 1422-1426.

ASPINALL (G.O).1959 - Structural chemistry of the hemicellulose. Advanced in carbohydrate Chem., 14, 429-468.

AYERS (W.A) PAPARIZAS (G.C).1965 - An exocellular pectolytic enzyme of *Aphanomyces euteiches*. Phytopathology, 55, 249-253.

BANKS (G.T), BINNS (F), CUTCLIFFE (R.L).1967 - Recent developments in the production and industrial applications of amylolytic enzymes derived from filamentous fungi. in Progress in industrial microbiology. (Hockenhull D.J.D., ed), 6, 95-139 , Heywood Books - London.

BARKER (K.R), WALKER (J.C).1962 - Relationship of pectolytic and cellulolytic enzyme production by strains of *Pellicularia filamentosa* to their pathogenicity. Phytopathology, 52, 1119-1125

BATEMAN (D.F).1964 - An induced mechanism of tissue resistance to polygalacturonase in *Rhizoctonia* infected hypocotyls of Bean. Phytopathology 54, 438 - 445.

BATEMAN (D.F) , MILLAR (R.L).1966 - Pectic enzymes in tissue degradation. Ann. Rev. Phytopathology. Vol.4, 119-146

BISHOP (C.T), BAYLEY (S.T), SETTERFIELD (G).1958 - Chemical constitution of the primary cell walls of *Avena* coleoptile Plant Physiology 283 - 289.

BLACK (L.A), PROUTY (C), GRAHAM (R.A).1932 - The effet of pasteurisation on the bacterial flora of low count milk. J. Dairy Sci., 15, 95.

BOMPEIX (G). 1969 - Note sur la biologie du *Phlyctaena vagabunda* DESM. Comparaison avec quelques autres parasites lenticellaires des pommes Golden. Rev. Mycol. , 33 (4) 268 - 283.

BOMPEIX (G), MORGAT (F).1969 - Lutte chimique contre les pourritures des pommes en conservation. Efficacité du bénomyl et du thiabendazole. C.R. Acad. Agri. France, 55 (II), 776 - 783.

BOMPEIX (G).1970 - Activités cellulolytiques et pectinolytiques dans les tissus de mésocarpe de pomme en culture in vitro en présence de *Gloeosporium spp.* C.R. Acad. Sc., 271, 369 - 399.

BOMPEIX (G).1970 - Intervention des facteurs nutritionnels dans le développement in vivo des parasites latents du type *Gloeosporium spp.* C.R. Acad. Sci., 271, 1623-1626.

BOMPEIX (G), MORGAT (F).1970 - Lutte contre les maladies de conservation d'origine parasitaire sur pommes. 100è Congrès Soc. Pomol. France - Valence - sur Rhône 2-3-4 Avril, 141 - 174.

BOMPEIX (G).1972 - Recherches sur la biologie du *Pezicula alba* GUTHRIE. Thèse D. Sc. Fac. Sc. Paris.

BOMPEIX (G).1973 - Communication personnelle.

BONDOUX (P), BOMPEIX (G), MORGAT (F), VIARD (P).1969 - Les principales pourritures des pommes et des poires en conservation. INVUFLEC 76 p. Paris.

BRAY (R.J.).1938 - Oxalic acid and enzyme secretion in relation to the parasitism of *Sclerotinia rolfsii*, *S. sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. Ph. D. Thesis. London university.

BROWN (W.).1915 - Studies in the physiology of parasitism .I. The action of *Botrytis cinerea*. Ann. Bot. Lond., 29, 313 - 348.

BROWN (W).1917 - Studies in the physiology of parasitism. IV. On the distribution of cytase in culture of *Botrytis cinerea*. Ann. Bot. Lon.31, 489-498.

BROWN (W).1955 - On the physiology of parasitism in plants. Ann. Appl. Biol. 43, 325-341

CHARPENTIER Madeleine .1968 - Dégradation de la cellulose dans le sol. Mécanismes enzymatiques. Ann. Inst. Pasteur, 115, 497 - 537.

COCHRANE (V).1958 - Physiology of fungi. J. WILEY and sons. Inc. ,New-York.

COLE (J.S.).1956 - Studies in the physiology of parasitism. xx The pathogenicity of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia fructigena*, and *S. laxa* , with special reference to the part played by pectolytic enzymes. Ann. Bot. Lond. N.S., 20, 15 - 38.

COLE (M), WOOD (R.K.S).1961 - Type of rot, rates of rotting and analyse of pectic substances in apple rotted by fungi. Ann. Bot. Lond. NS, 25, 417 - 434.

COLE (M), WOOD (R.K.S.).1961 - Pectic enzymes and phenolic substances in apples rotted by fungi. Ann. Bot. Lond. N.S., 25, 435 - 452.

COWLING (E.B).1965 - Microorganisms and Microbial enzyme systems as selective tool in wood anatomy.in cellular Ultrastructure of woody Plants. Syracuse University press, Syracuse IN.Y.

DAVIGNON (L).1961 - Contribution à l'étude de l'évolution chimique des substances pectiques au cours de la croissance, de la maturation et de la sénescence des fruits. Thèse Doct. Ing. Fac. Sci. Paris - 30 p.

DAVISON (F.R),WILLIAMAN (J.J).1927 - Biochemistry of plant diseases.IX Pectic enzymes - Bot. Gaz. ,83, 329 - 361.

DE BARY (A).1886 - Uber einige Sclerotinien und Sclerotienkrankheiten Botan.Z, 44 , 377 - 474.

DEMAIN (A.L), PHAFF (H.J).1957 - Recent advances in the enzymatic hydrolysis of pectic substances - Walerstein Lab. Commun., 20, 119 - 140.

DICKINSON (D.B), Mc COLLUM (J.P).1964 - Cellulase in tomato fruits. Nature, Vol. 203, 525 - 526.

DINGLE (J), REID (W.W), SOLOMONS (G.L).1953 - The enzymatic degradation of pectin and other polysaccharides. II Application of the "cup plate" assay to the estimation of enzymes. J. Sci. Food. Agri., 4, 149 - 155.

DOESBURG (J.J).1965 - Pectic substances in fresh and preserved fruits and vegetables. Inst. for Res. on storage and processing horticultural produce, Wagenigen 152 p.

DORN (G), RIVER (W).1966 - Kinetics of fungal growth and phosphatase formation in *Aspergillus nidulans*. J. Bact., 92, 1618.

ECHANDIE (E), WALKER (J.C).1957 - Pectolytic enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. Phytopathology, 47, 303 - 306.

EDNEY (K.L).1958 - Observations on the infection of Cox's Orange Pippin apples by *Gloeosporium perennans* ZELLER et CHILDS. Ann. App. Biol. 46, 622.

EDNEY (K.L).1964 - A comparaison of the production of extracellular enzymes and rotting of apples by *Pezicula alba* and *P. malicorticis*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 47, 215.

FOSTER (J.W).1949 - Chemical activities of fungi. 1 Vol. Academic Press. New-York.

FUSHTEY (S.G).1957 - Studies on the physiology of parasitism . XXIV Further experiments on the killing of plant cells by fungal and bacterial extracts. Ann. Botany. Lond., 21, 273 - 286

GAUMANN (E).1954 - Toxins and plant diseases. Endeavour 13, 198 - 204.

GEYPENS (M), DESAI (B.G), VAN ASSCHE (C).1971 - Recherches sur les activités enzymatiques des filtrats de culture du *Stemphylium botryosum* WALLR. et d'extraits de pommes ou de poires saines ou parasitées par *Stemphylium* (résumé). Annales de Phytopathologie, 3, (4), 532.

GLENZA (A).1969 - Etude du système protéolytique de *Penicillium caseicolum*. Facteurs de production. Purification partielle et propriétés de la protéase principale. Thèse D. 3ème cycle. Fac. Sci. Caen.

GOODMAN (R.N), KIRALY (Z), ZAITLIN (M).1967 - The biochemistry and Physiology of infectious Plant disease. D. Van. Nostrand company. Inc. U.S.A. 354 PP.

HANCOCK (J.C), MILLAR (R.L), LOBEER (J.W).1964 - Pectolytic and cellulolytic enzymes produced by *Botrytis allii*, *B. cinerea*, and *B. squamosa* in vitro and in vivo. Phytopathology, 54, 928 - 931.

HANCOCK (J.G), MILLAR (R.L).1965 - Association of cellulolytic, proteolytic, and xylolytic enzymes with southern Anthracnose Spring black stem, and Stemphylium leaf spot of Alfalfa. Phytopathology, 55, 356-360.

HARTER (L.L), WEIMER (J.L).1923 - The relation of the enzyme pectinase to infection of sweet potatoes by *Rhizopus*. Am. J. Botany, 10, 245 - 258.

HASEGAWA (S), NAGEL (C.W).1962 - The characterization of an α-β-unsaturated digalacturonic acid. J. Biol. Chem., 327, 619 - 621.

HORSFALL (J.G), DIMOND (A.E).1959 - Plant Pathology. Vol.1. Acad. Press. New-York and London - 674 p.

HORTON (J.C), KEEN (N.T).1966 - Sugar repression of endo-polygalacturonase and cellulase by *Pyrenochaeta terrestris* as résistance mechanism in onion pink root. Phytopathology, 56, 908 - 916.

HRUSHOVETZ (S.B).1957 - Effect of amino acids on the virulence of *Helminthosporiu sativum* to wheat seedlings. Phytopathology, 47, 261 - 264.

HULME (A.C).1958 - Some aspects of the biochemistry of apple and pear fruit. Biochem. J., 86, 358 - 365.

HULME (A.C),EDNEY (K.L).1960 - Phenolic substances in the peel Cox's Orange Pippin apples with reference to infection by *Gloeosporium perennans*. Phenolic in plant in health and disease, 87 - 94 (J.B. Pridham)

HUSAIN (A), DIMOND (A.E).1958 - Cellulolytic activity of some apple rotting fungi.(Abstr.) Phytopathology, 48, 263.

JOLY (P).1964 - Le genre *Alternaria* . Lechevalier Paris - 250 p.

JOSLYN (M.A).1962 - The chemistry of protopectine : A critical of review of historical data and recent developments. . Adv. in food.Res.,11, 1 - 107.

KARLSON (P).1969 - Introduction to Modern Biochemistry. Third edition. 483 p. Academic Press New-York and London

KELMAN (A), COWLING (E.B).1965 - Cellulase of *Pseudomonas solanacearum* in relation to pathogenesis. Phytopathology, 55, 148 - 155.

KELMAN (A), COWLING (E.B). 1967 -Measurement of cellulase activity of plant pathogens using DNS test for reducing sugars. in (Sourcebook of Laboratory Excercises in Plant Pathology) Freeman and company San Francisco and London 192 - 194.

KERTESZ (Z.I).1951 - Pectic enzymes in The enzymes , Vol.1. Sumner J.B., MYRBACK K., Academic press, New-York , 745 - 769.

KERTESZ (Z.I). 1955 - The pectic Enzymes in Methods in Enzymology, Vol. 1 p 158, Ed. COLOWICK S.P et KAPLAN N.O, Academic Press. New-York and London.

KIRPAL (S.A), RAJENDRA (K.G), MALHOTRA (S).1970 - Utilization of free amino acids, in vivo and in vitro by isolates of *Phoma destructiva* PLOWR. Phytopathologia mediterranea, 6, 8 - 12.

KIVILLAN (A), BEAMAN (T.C), BANDURSKI (R.S).1959 - A partial chemical characterization of Maise coleoptile cell walls prepared with the aid of a continually renewable filtre. Nature , 184, 81.

KOHLMEYER (J).1956 - Uber den cellulose abbau durch einige phytopathogene Pilze. Phytopathol. Z., 27, 147 - 182.

KUC (J), WILLIAMS (E.B).1962 - Production of proteolytic enzymes by four pathogen of apple fruit. Phytopathology, 52, 739 (Abst.)

LAMPORT (D.T.A).1965 - The proteins component of primary cell wall. Advances Bot. Res., 2, 151 - 218.

LAMPORT (D.T.A).1969. The isolation and partial characterization of hydroxyproline rich glycopeptides obtained by enzymic degradation of primary cell walls. Biochemistry, 8, 1155 - 1163.

LAMPORT (D.T.A).1970 - Cell wall metabolism . Ann. Rev. Plant Physiology, 21 235 - 270.

LANCE (C). 1963 - Recherches sur la croissance et le métabolisme respiratoire de tissus végétaux normaux et tumoraux cultivés "in vitro". Thèse D. Sc. Fac. Sc. PARIS - Masson & Cie. Ed.

LOCKHART (C.L).1967 - Influence of controlled atmospheres on the growth of *Gloeosporium album* in vitro. Can. J. Pl. Sci., 47(6), 649-651

MARAITE (H).1969 - Pathogénie du flétrissement du Melon causé par *Fusarium oxysporum* F. sp. melonis. Thèse Dr. Sc. Agr. Univ. Cat. Louvain 77p

MARSH (P.B), MEROLA (G.V), SIMPSON (M.E).1953 - Experiments with an alkali swelling centrifuge test applied to cotton fiber. Textile Res. J. 23, 831 - 841.

MARTIN (J.T.), JUNIPER (B.E).1970 - The Cuticles of Plants. Edward Arnold (Publishers) Ltd. 347 p.

MILLER (D.H), LAMPORTE (D.T.A).1968 - Hydroxyproline rich glycoproteins in cell walls of the liverwort, *Sphaerocarpos donnelli* AUST. Plant physiology meeting in Plant. Physiol., 43.

MLAIKI (A).1970 - Pourriture à *Gloeosporium* des pommes "Golden delicious" au cours de leur conservation. Thèse Doct. Ing. Fac. Sci. Toulouse, 100 p.

NITSCH (J.P), ASAHIRA (T), ROSSINI (Luisa M.E), NITSCH (Colette). 1970 - Bases physiologiques de la production de chair de pomme et de poire in vitro. Bull. Soc. Bot. France, 117, 479 - 493.

NORKRANS (Brigitta).1963 - Degradation of cellulose. Ann. Rev. Phytopathology 1, 325 - 350.

OLSON (A.C).1964 - Proteins and plant cell walls. Proline to hydroxyproline in tobacco suspension cultures. Plant Physiol. 39, 543 - 550.

PETTERSON (G), COWLING (E.B), PORATH (J).1963 - Studies on cellulolytic enzymes. Isolation of a low molecular weightcellulase from *Polyporus versicolor*. Biochim. Biophys. Acta, 67, 9 - 15.

PILET (P.E).1971 - Les parois cellulaires. DOIN - Paris - 170 p.

REESE (E.T), SIU (R.G.H), LEVINSON (H.S).1950 - The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. J. Bacteriol, 59, 485 - 497.

REESE (E.T), LEVINSON(H.S).1952 - A comparative study of break-down of cellulose by microorganisms. Physiol. Plantarum,5, 345 - 366.

REESE (E.T), MANDEIS (M).1963 - Enzymatic hydrolysis of β-glucans in Symp. Advan. Enzymatic Hydrolysis of cellulose and Related Mater., Washington (REESE E.T., Ed., Pergamon Press, New-York)

SCHULTZ (T.H), LOTZKAR (H), OWENS (H.S), MACLAY (W.D).1945 - Influence of method of desesterification on the viscosity and acid behavier of pectinic acid solutions. J. Phys. Chem. ,49, 554 - 563.

SCHULZ (F.A).1972 - Untersuchungen uber die bildung pektinolytischer und zellulolytischer enzyme durch *Gloeosporium perennans*. Phytopath. Z., 74, 97 - 108.

SOLMS (J), DEUEL (H), .1955 - Uber den mechanismus der enzymatischen vers eifung von pektins stoffen. Helv. Chim. Acta., 38, 321 - 329

STEINBERG (R.A).1950 - Growth of fungi in synthetic nutrient solutions. II Bot. Rev. , 16, 208 - 228.

STRIDER (D.S).1959 - Studies on the physiology of parasitism as related to scab of cucumber incited by *Cladosporium cucumerinum*. Doctoral thesis, North Carolina state College.

STRIDER (D.L), WINSTEAD (N.N).1961 - Production of cell-wall dissolving enzymes by *Cladosporium cucumerinum* in cucumber tissue and in artificial media. Phytopathology, 51, 765 - 768.

STROBEL (G.A).1963 - A xylanase system produced by *Diplodia viticola*. Phytopathology, 53 , 592 - 596.

THIBODEAU (R.), MACY (H). 1942 - Growth and enzymes activity of *Penicillium roqueforti*. Minn. Agr. Expt. Sta. Tech. Bul. , 152, 1.

THOMAS (R), WHITAKER (D.R). 1958 - Zone electrophoresis of *Myrothecium* cellulase. Nature, 181 , 715 - 716.

TOUZE (A).1964 - L'Anthracnose du Melon. Etude de quelques manifestations physiologiques. Thèse Doct. Sciences. Fac. Sci. Toulouse. 122 p.

TRIBE (H.T).1955 - Studies in the physiology of parasitism .XIX - On the killing of plant cells by enzymes from *Botrytis cinerea* and *Bacterium aroideae*. Ann. Botany. Lond., 19, 351 - 368 .

ULRICH (R). 1952 - La vie des Fruits. Masson & Cie Paris. 365 p.

ULRICH (R), MIMAULT (J). 1956 - Transformation des composés pectiques (pectines et protopectines) au cours de la maturation des Poires paraffinées Fruit, 7, 273.

ULRICH (R). 1958 (a) - Post harvest physiology of fruit. Ann. Rev. Plant. Physiol. 9, 385-416.

ULRICH (R).1956 (b) - Travaux récents sur les échanges gazeux et le métabolisme des fruits. Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég. , 4 , 1 - 17.

VAN ANDEL (O.M).1966 - Amino acids and plant diseases. Ann. Rev. of Phytopathology, 4, 349 - 368.

VASUDEVA (R.S). 1930 - Studies in the physiology of parasitism . XI. An analysis of the factors underlying specialization of parasitism with special reference to the fungi *Botrytis allii* and *Monilia fructigena* . Ann. Bot. , XIiv, 469 - 493.

VIENNOT-BOURGIN (G).1949 - Les Champignons Parasites des Plantes cultivées. Masson & Cie. Paris - 2 vol. 1854 p.

VIENNOT-BOURGIN (G).1966 - Les Champignons parasites des espèces fruitières en zone méditerranéenne. Acte du 1er Congrès de l'Union phytopath. méditerrannéenne Bari-Naples (Italie).29/9 - 1/10 - 1 - 35

VIENNOT-BOURGIN (G). 1969 - Physiologie du parasitisme. INA Paris.

WALKER (J.R.L.).1970 - Phenolase inhibitor from cultures of *Penicillium expansum* which may play a part in fruit rotting. Nature, 227, (5255) - 298 - 299.

WALLACE (J), KUC (J), DRAUDT (H.N).1962 - Biochemical changes in the water insoluble material of maturating apple fruit and their possible relationship to disease resistance. Phytopathology, 52, 1023-1027.

WARD (H.M).1888 - A lily-disease. Ann. Bot. 2, 319 - 382.

WOOD (R.K.S.).1955 - Pectic enzymes secreted by pathogens and their role in plant infection. Symposium. Soc. Gen. Microbiol., 5, 263 - 293.

WOOD (R.K.S).1967 - Physiological Plant pathology. Blackwell scientific publication, Oxford, 570 p.

°

° °